

ACÇÃO ANTI-NUTRICIONAL DAS FITO-HEMAGLUTININAS DE *Phaseolus vulgaris*, L.¹

Maria O. R. Figueroa², Jorge Mancini Filho³ e Franco M. Lajolo³

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

RESUMO

Os autores estudaram, em ratos, o efeito da ingestão das lectinas isoladas dos feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) das variedades Jalo e Rico 23. Diferentes quantidades de lectinas foram adicionadas à dietas experimentais, variando-se a quantidade de proteínas de 5% até 20%. A adição de 1% das lectinas do feijão Jalo provocou diminuição no crescimento dos ratos, alterou a glicemia sérica e, também, reduziu a atividade da maltase e da invertase da mucosa intestinal. Efeitos semelhantes foram verificados com 5% de lectinas obtidas do feijão Rico 23. Concentrações elevadas de proteínas na ração (20%) parece compensar eventuais alterações metabólicas.

INTRODUÇÃO

Fito-hemaglutininas ou lectinas são glicoproteínas presentes nos feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) e em outros vegetais. Apresentam diversas propriedades biológicas, destacando-se a capacidade de estimular a mitose em culturas de linfócitos (1), aglutinam diferentes tipos de células: linfócitos, eritrócitos e células cancerosas (2); precipitam polissacarídeos e outras glicoproteínas (3), além de terem efeito anti-nutricional quando ingeridas. Todas essas propriedades parecem decorrentes da capacidade das lectinas de reconhecerem e se ligarem a carboidratos presentes nas células ou a outras glicoproteínas (4).

Manuscrito modificado recebido: 24-5-84.

- 1 Esta pesquisa foi realizada com subvenção da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e da OEA.
- 2 Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).
- 3 Professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Conjunto dos Químicos B.14, Caixa Postal 30. 786, CEP 05508, São Paulo, Brasil.

As lectinas tem sido objeto de diferentes estudos em função da sua multiplicidade de ação e devido a isto surgiram diversas revisões reunindo os aspectos mais significativos dessas substâncias (5-7).

Jaffé e Camejo (8) e Jaffé e Brucher (9) foram os primeiros a correlacionar os aspectos anti-nutricionais em feijões com a presença das lectinas. Honavar, Smith e Liener (10) e Mancini e Lajolo (11), por outro lado, verificaram que era possível classificar os feijões em tóxicos e não tóxico em função das diferenças de especificidade de suas lectinas na aglutinação de hemácias de bovino e de cunino. Outros estudos de Jaffé (7), demonstraram a possibilidade das lectinas participarem do processo de bloqueio da absorção de nutrientes na mucosa intestinal, procurando, desta forma, justificar a interferência no crescimento dos animais que as consumiam.

Outros trabalhos foram feitos tentando elucidar a participação das lectinas de feijões no processo toxicológico ou anti-nutricional, destacando-se os de Kakade e Evans (12), Liener (13) e Pusztai *et al.* (14). Esses autores apresentam diversas idéias baseadas na possibilidade dessas substâncias causarem a ruptura das células do epitélio intestinal, provocando assim desordem no intercâmbio de nutrientes além de alterações nas barreiras a substâncias tóxicas presentes na luz intestinal.

Os trabalhos nutricionais visando ao conhecimento do efeito anti-fisiológico das lectinas tem sido realizados, de maneira geral, com rações experimentais contendo 5% ou 10% de proteínas, não existindo referência para valores protéicos mais elevados. No presente trabalho estudamos, comparativamente, o efeito da ingestão de duas variedades de feijões: Jalo e Rico-23 a nível de crescimento e a nível bioquímico avaliando-se algumas enzimas intestinais e, também, o efeito da proteína dietética sobre a ação anti-nutricional. Essas duas variedades foram escolhidas por terem toxicidades diferentes pela via intra-peritoneal (11).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os feijões utilizados (*Phaseolus vulgaris*, L.), das variedades Jalo e Rico-23, foram obtidos na Estação Experimental de Lavras, Minas Gerais.

A escolha destas duas variedades foi baseada numa classificação de toxicidade já feita anteriormente por Mancini e Lajolo (11) e foram submetidas a novo ensaio para confirmação. Extratos protéicos com a mesma concentração de proteínas (6 mg/ml) foram injetados intraperitonealmente em camundongos (1 ml/100 g de peso), avaliando-se o número de mortes em cada caso, além da aglutinação face a hemácias de bovino. Os resultados da Tabela 5 mostram que realmente o Jalo é tóxico e o Rico 23 não tóxico por via intraperitoneal.

Para a obtenção das fito-hemaglutininas, uma suspensão de farinha de feijão a 20% em solução fisiológica, foi mantida sob agitação mecânica por duas horas a temperatura ambiente. Posteriormente foi centrifugada a 5.000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi separado e o pH ajustado a 4.2 com HCl 0.5 N. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, ajustado a pH 7.0, foi submetido à ação de celite-bentonite (1:1), na proporção de 10% do peso inicial de farinha, com a finalidade de retirar o inibidor de tripsina da preparação (10). Após uma noite de agitação, o sobrenadante foi separado e submetido à precipitação com

etanol até concentração de 65^o/o ou a precipitação fracionada com sulfato de amônio, utilizando-se a fração que precipita entre 50 e 75^o/o de saturação. A atividade hemaglutinante específica foi semelhante para ambos métodos de obtenção das fito-hemaglutininas.

As frações obtidas por precipitação com etanol ou pelo sulfato de amônio apresentaram atividade anti-amilásica semelhante e entre 55^o/o e 60^o/o da inicial (atividade anti-amilásica inicial: 0.50 UIA/mg⁴ de proteína).

A atividade antitripsina ficou entre 2^o/o e 5^o/o em relação à inicial (atividade antitripsina inicial: 46 mg I.T./g prot.).

O rendimento da preparação de fito-hemaglutinina era em média 3^o/o do peso inicial de farinha de feijão.

A atividade aglutinante foi determinada pelo método de microtitulação, com o equipamento "Micro-titer" da Cole Eng. Comp., Alexander, Virginia, USA, utilizando-se hemácias de coelho e de bovino tratadas com tripsina. O doseamento de proteínas foi feito pelo método de Lowry *et al.* (15) e a atividade inibidora de tripsina segundo Kakade, Simons e Liener (16). A atividade anti-amilásica foi determinada pelo método de Bernfeld modificado por Lajolo (17). A determinação das dissacaridases (maltase e invertase) segundo método de Dahlqvist (18). A fosfatase alcalina do tecido foi determinada pelo método de Fishman, Green e Inglis (19) e o método de glicoseoxidase foi utilizado na determinação da glicose do soro (18).

Ensaios com animais: Foram preparadas rações experimentais que continham, conforme a experiência, percentagens diferentes de proteína (caseína de 5^o/o até 20^o/o), 8^o/o de óleo de soja, 4^o/o de mistura salina, 1^o/o de mistura vitamínica, 4^o/o de fibra (sabugo de milho) e amido q.s.p. 100^o/o. Nas rações assim preparadas foram adicionadas as fito-hemaglutininas às expensas do amido.

Para inativação a fito-hemaglutinina era tratada em autoclave, a 120^oC durante 20 minutos, ocorrendo então perda total da atividade aglutinante.

As rações foram administradas a grupos de 6 animais e observados o crescimento, a glicemia sérica e as atividades maltásicas, invertásicas e fosfatásicas da mucosa intestinal.

Os animais utilizados nos ensaios biológicos foram ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) obtidos das colônias do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Eram machos, na fase de crescimento, com idades variando de 21 a 25 dias e as experiências tiveram uma variação média de 10 a 12 dias.

As dissacaridases intestinais foram estimuladas pela administração de uma solução de sacarose 20^o/o por sonda estomacal, 30 minutos antes do sacrifício.

Ensaios in vitro: Para se verificar uma eventual ação inibidora direta na atividade enzimática, foram realizados com extratos brutos das enzimas

4 UIA = Unidades do inibidor de amilase, sendo que: 0.1 UIA correspondem à inibição total (100^o/o) de 1 UI de α -amilase salivar.

UI = 1 Unidade internacional de amilase correspondem a produção de 1 μ mol de maltose/min, 37^oC.

isoladas, os quais foram incubadas com fito-hemaglutininas avaliando-se em seguida a possível inativação ocorrida ou não.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Numa experiência inicial verificamos que a adição de 10% de lectinas do feijão Rico 23 a rações contendo 20% de caseína não provocava qualquer efeito anti-nutricional; o crescimento e o coeficiente de aproveitamento alimentar não se alteravam.

Em vista desses resultados pensamos que a elevada concentração de proteína de boa qualidade da ração poderia ter influência no efeito tóxico. De fato os resultados da Tabela 1 mostram que com a redução do teor de proteína para 15%, em presença de 20% de fito-hemaglutininas por 12 dias, alteravam-se tanto o aproveitamento alimentar como a atividade da invertase e da maltase intestinais. Na Tabela 1 pode-se verificar que apesar de não haver diferença significativa no crescimento dos animais dos dois grupos, possivelmente devido à alimentação pareada, houve menor aproveitamento (CEA) da ração com lectinas ativas e, da mesma forma, as atividades das dissacaridases intestinais diminuíram sensivelmente.

Está descartada, no caso, a possibilidade do efeito sobre as enzimas ser indireta ou seja consequência de uma desnutrição protéico-calórica instalada no animal, porque é sabido que nessas situações a atividade enzimática costuma aumentar e não diminuir (20).

Reduzindo-se ainda mais o teor de proteína, para 5% de caseína o efeito tóxico aparece também a nível de crescimento (Tabela 4), e não só a nível enzimático.

O efeito protetor da proteína ficou mais claro quando estudamos o feijão Jalo cujas lectinas são, aparentemente, mais ativas que as do Rico 23 (Tabelas 2, 3 e 4).

Em todas as experiências mantiveram-se grupos par-alimentados para assegurar que o efeito não fosse decorrente simplesmente de um problema de ingestão reduzida de alimento. De fato verifica-se pelas Tabelas 2, 3 e 4 que os grupos com restrição (grupos pareados) e *ad libitum*, consumindo ração sem PHA, não mostraram grandes diferenças nos parâmetros estudados; mesmo a ração limite com apenas 5% de caseína, com e sem restrição não mostrou diferenças. Ficou assim comprovado que de fato, é uma ação direta das aglutininas a causadora dos efeitos observados e não apenas uma decorrência da ingestão reduzida de alimento. Esse ponto não estava suficientemente claro em trabalhos de outros autores (12, 21).

As aglutininas do feijão Jalo na proporção de 10% em rações contendo 20% de caseína (Tabela 2) não exerceram efeito no crescimento dos animais e, naqueles com 10% de caseína (Tabela 2), o efeito foi pequeno; porém a sua influência fica clara quando o teor de proteína é reduzido até 5% (Tabela 4). Observamos, por outro lado, inibição clara da atividade maltásica e invertásica da mucosa intestinal em todos os grupos independentes da concentração protéica. Essa redução na atividade enzimática foi acompanhada de perto por uma redução da glicemia sérica indicando uma possível relação de causa-efeito.

E interessante observar que nos grupos controle, ao contrário do

TABELA 1
CRESCIMENTO E ATIVIDADE DE MALTASE E INVERTASE INTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS A
INGESTÃO DE 2% DE AGLUTININAS DO RICO 23 E ALIMENTAÇÃO PAREADA,
15% DE PROTEINA NA RAÇÃO

Grupo	Peso, g		Consumo de ração g	CEA***	Atividade U/mg proteína x 10 ⁻²	
	Inicial	Final			Invertase	Maltase
FHG ativa	69.0 ± 8.1*	74.6 ± 7.4	81.7 ± 10.6	0.069 ± 0.055 ^a	1.21 ± 0.41 ^c	9.58 ± 2.3 ^c
FHG aquecida**	69.0 ± 6.8	82.4 ± 4.9	81.7 ± 4.6	0.164 ± 0.049 ^b	2.95 ± 0.82 ^d	19.15 ± 1.2 ^d

FGH = Fito-hemaglutininas.

* Desvio padrão.

** Grupo par alimentado.

*** Aumento de peso/consumo.

a ≠ b (P ≤ 0.01).

c ≠ d (P ≤ 0.05).

TABELA 2
CRESCIMENTO, COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTAR (CEA), ATIVIDADE DA MALTASE E, INVERTASE INTESTINAL E GLICEMIA, DE RATOS SUBMETIDOS À RAÇÕES COM 20% DE PROTEÍNAS (CASEÍNA) E 1% DE FHG DO FEIJÃO JALÓ

	Peso, g		Consumo de ração, g	CEA**	Atividade U/mg protefna x 10 ⁻²		Glicose no soro, mg/ml
	Inicial	Final			Invertase	Maltase	
Sem FHG <i>ad libitum</i>	44.0 ± 6.4*	84.5 ± 11.7	85.0 ± 12.1	0.477 ± 0.038	2.30 ± 0.39	22.5 ± 3.3	0.64 ± 0.11
Sem FHG — par alimentado	44.0 ± 7.9	77.7 ± 10.5	76.0 ± 8.7	0.443 ± 0.044	2.82 ± 0.68 ^a	19.0 ± 4.8 ^a	0.72 ± 0.13 ^a
1% FHG	44.2 ± 6.5	77.2 ± 9.1	77.6 ± 8.8	0.426 ± 0.060	1.17 ± 0.25 ^b	11.4 ± 2.0 ^b	0.49 ± 0.13 ^b

* Desvio padrão.

** Aumento de peso/consumo.

a ≠ b (0.01 ≤ P ≤ 0.01).

TABELA 3

CRESCIMENTO, COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR (CEA), ATIVIDADE DA MALTASE E, INVERTASE INTESTINAL E GLICEMIA, DE RATOS SUBMETIDOS A RAÇÕES COM 10% DE PROTEÍNAS (CASEÍNA) E 1% DE FHG DO FEIJÃO JALÓ

	Peso, g		Consumo de ração, g	CEA**	Atividade U/mg proteína x 10 ⁻²		Glicose no soro, mg/ml
	Inicial	Final			Invertase	Maltase	
Sem FHG <i>ad libitum</i>	43.3 ± 7.5*	69.3 ± 7.7	85.7 ± 7.3	0.303 ± 0.056	3.01 ± 0.36	23.6 ± 3.1	0.78 ± 1.14
Sem FHG — par alimentados	45.0 ± 7.2	64.7 ± 6.5	74.6 ± 4.0	0.264 ± 0.045	3.58 ± 0.69 ^a	25.4 ± 4.1 ^c	0.71 ± 0.22 ^c
1% FHG	44.2 ± 6.3	60.8 ± 8.2	72.1 ± 7.3	0.230 ± 0.047	2.58 ± 0.55 ^b	16.3 ± 2.2 ^d	0.49 ± 0.06 ^d

* Desvio padrão.

** Aumento de peso/consumo.

a ≠ b (P < 0.05).

c ≠ d (P < 0.01).

TABELA 4

CRESCIMENTO, CEA, ATIVIDADE DE MALTASE E INVERTASE INTESTINAL E GLICEMIA DE RATOS SUBMETIDOS À RAÇÕES COM 50% DE PROTEÍNAS (CASEÍNA), E 10% DE FHG DE JALO OU 10% E 50% DE FHG DO RICO 23

	Peso, g		Consumo de ração, g	CEA**	Atividade U/mg proteína x 10 ⁻²		Glicose no soro, mg/ml
	Inicial	Final			Invertase	Maltase	
Sem FHG <i>ad libitum</i>	43.5 ± 7.4*	54.5 ± 7.6	81.2 ± 14.2	0.13 ± 0.03	4.2 ± 1.2	27.8 ± 5.5	0.68 ± 0.12
Sem FHG par alimentado	44.0 ± 6.6	53.3 ± 6.5 ^a	73.4 ± 6.8	0.13 ± 0.05 ^a	3.4 ± 0.4 ^a	25.4 ± 3.8 ^a	0.77 ± 0.11 ^a
10% FHG Jalo <i>ad libitum</i>	43.7 ± 7.4	45.2 ± 4.9 ^b	69.5 ± 5.4	0.02 ± 0.02 ^b	1.2 ± 0.4 ^b	9.7 ± 2.4 ^b	0.45 ± 0.04 ^b
10% FHG Rico 23 <i>ad libitum</i>	44.3 ± 6.6	51.3 ± 6.4	73.8 ± 9.4	0.09 ± 0.03	2.9 ± 0.4	15.9 ± 2.2 ^b	0.58 ± 0.08 ^b
50% FHG Rico 23 <i>ad libitum</i>	44.0 ± 6.7	45.0 ± 5.5 ^c	68.0 ± 6.8	0.01 ± 0.04 ^c	2.4 ± 0.2	20.0 ± 3.5 ^c	0.40 ± 0.12 ^c
50% FHG Rico 23 par alimentado	44.0 ± 6.7	51.5 ± 3.3 ^d	70.5 ± 2.7	0.11 ± 0.04 ^d	2.7 ± 0.8	25.9 ± 4.3 ^d	0.62 ± 0.11 ^d

* Desvio padrão.

** Aumento de peso/consumo.

a ≠ b (0.001 ≤ P ≤ 0.01).

c ≠ d (P ≤ 0.05).

crescimento, que foi maior quanto maior o teor de proteína na ração, as atividades da maltase e principalmente da invertase, variavam no sentido inverso, sendo mais altas nos animais submetidos a um menor teor protéico, fato que pode ser explicado pelo aumento relativo do teor de carboidratos na dieta (20).

Nos intestinos dos animais submetidos a rações com 50/o de proteínas avaliamos também a atividade da fosfatase alcalina. Essa enzima foi estudada pelo fato de ser intracelular, ligada a várias organelas e membranas e a sua alteração poderia indicar a desorganização do enterócito. Ela não sofreu porém qualquer alteração. O mesmo aconteceu com a atividade proteolítica da mucosa intestinal avaliada usando-se o BAPA (Benzoil DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato.

Na Tabela 4 encontram-se também, para efeito comparativo, os resultados obtidos com o feijão Rico 23 mas ao contrário da experiência da Tabela 1, ensaiados com teores de apenas 50/o de caseína na ração. Como já referido nesse caso a ação tóxica se manifesta em todos os níveis desde o crescimento até as mudanças enzimáticas de forma mais evidente.

Devemos ressaltar (ver Tabela 4), que a adição de 50/o de proteína (provida da lectina inativa), à ração com 50/o de caseína, elevando a proteína total para 100/o, não melhorou o crescimento dos ratos. O fato reforça a necessidade de se estudarem a digestibilidade e o aproveitamento biológico das frações protéicas dos feijões.

É importante observar que no caso, a atividade aglutinante, face a hemácias de bovinos, das lectinas do Jalo (a 10/o) é equivalente a do Rico 23 a 50/o na ração, mostrando que são ambos tóxicos no mesmo nível e a toxicidade tem relação com a capacidade aglutinante. O efeito pela via oral porém não manteve relação com a toxicidade testada pela via intraperitoneal em camundongos como mostra a Tabela 5.

Pelos resultados obtidos parece que as mudanças nas atividades enzimáticas junto com a glicemia, são parâmetros sensíveis para se detectar ação anti-nutricional das aglutininas já que acontecem e podem ser avaliadas antes das mudanças no crescimento. Por outro lado, apesar da maltase e da invertase estarem juntas, em um mesmo complexo enzimático no enterócito (22), a maltase é mais sensível à inibição, do que a invertase (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Durante o desenvolvimento do nosso trabalho, os dados publicados por Rouanet e Besanção (23) confirmaram os nossos.

Paralelamente aos ensaios relatados fizemos testes *in vitro* com extratos de mucosa intestinal e com as enzimas parcialmente purificadas por precipitação fracionada. Em nenhum caso porém a maltase ou a invertase foram inibidas *in vitro* pelas aglutininas, mostrando que o efeito tóxico se dá ao nível da complexa estrutura da bordadura em escova.

Em vista da conhecida capacidade de outras lectinas de interferirem na síntese protéica *in vitro* (24), é possível que as aglutininas de feijões tenham ação semelhantes. Outra possibilidade seria a de que o efeito fosse devido à ligação da aglutinina com receptores específicos, impedindo a indução de enzimas de hidrólise e de transporte. Finalmente, em vista dos trabalhos de Pusztai *et al.* (14) que observou ruptura dos enterócitos, a queda na atividade enzimática poderá ser devida, simplesmente à presença de maior número relativo de enterócitos jovens. O efeito da proteína favorece essa idéia, pois um elevado consumo leva a maior velocidade de

TABELA 5

ATIVIDADE AGLUTINANTE* E TOXICIDADE DAS VARIEDADES JALO
E RICO 23 DE *Phaseolus vulgaris*, L.

Variedade	Hemácias		Toxicidade (i.p. camundongos) No. mortos/No. injetados
	Bovino	Coelho	
Jalo	1/22.9	1/11.4	6/6
Rico 23	1/2.3	1/4.5	0/6

* Atividade específica: título aglutinante/mg proteína.

renovação de células epiteliais. Essas hipóteses serão objeto de um próximo trabalho.

SUMMARY

ANTINUTRITIONAL EFFECT OF PHYTOHEMAGGLUTININS OF THE
VARIETIES JALO AND RICO 23 OF KIDNEY BEANS (*Phaseolus vulgaris*, L.)

The antinutritional effect caused by the ingestion of lectins from two Brazilian varieties of beans: Rico 23 and Jalo, was studied in rats. The two varieties were selected in a previous screening of toxicity in rats: one of them (Jalo) was lethal, and the other (Rico 23) was not, when injected intra-peritoneally. Different amounts of each one of the lectins were added to casein experimental diets and fed to rats. The amount of protein (casein) also varied from 5% to 20%. The addition to the diet of 1% lectins from the Jalo variety caused a growth depression, as well as a decrease in food efficiency ratio and serum glucose; also, it reduced the maltase and invertase activity of the intestinal mucosa. All these effects appeared when the protein contents in the rations were 5% or 10%. At the 20% level only a depression of the maltase activity was observed. Similar effects were shown by the lectins of the Rico 23 variety, but only when added in a higher (5%) percentage to the diet. The phosphatase and protease activity were not changed by any of the lectins. The inhibitor activity that occurred *in vivo* was not detected *in vitro*.

RESUMEN

ACCION ANTI-NUTRICIONAL DE LAS FITO-HEMAGGLUTININAS DEL
Phaseolus vulgaris, L.

Los autores estudiaron, en ratas, el efecto de la ingestión de lectinas aisladas del frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.), variedades brasileras, Jalo y Rico 23. Se agregaron diferentes cantidades de lectinas a las dietas experimentales, variando la cantidad de proteínas de 5% a 20%. La adición de 1% de lectinas de la variedad Jalo indujo un descenso en el crecimiento de las ratas, alteró la glucosa sérica y, además, redujo la

actividad de la maltasa y de la invertasa de la mucosa intestinal. Se constataron efectos semejantes con el agregado de 50/o de lectinas obtenidas del frijol Rico 23. Según parece, la inclusión de concentraciones elevadas de proteínas en la ración (200/o), compensa eventuales alteraciones metabólicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Nowell, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis, in cultures of human leukocytes. *Cancer. Res.*, **20**:462-466, 1960.
2. Nungester, W. J. & G. Van Halsema. Reaction of certain phytoagglutinins with Flexner-Jobling carcinoma cells of the rat. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **83**:863-866, 1953.
3. Lys, H. & N. Sharon. The biochemistry of plant lectins. *Ann. Rev. Biochem.*, **22**:541-574, 1973.
4. Sharon, N. Lectins. *Scientific American*, **236**:108-119, 1977.
5. Kaus, H. Plant lectins (Phytohemagglutinins). In: *Progress in Botany*. H. Ellenberg (Ed.). Springer Verlag, 1976, p. 58.
6. Liener, I. E. Phytohemagglutinins. *Ann. Rev. Plant Physiology*, **27**:17, 1974.
7. Jaffé, W. G. Hemagglutinins. In: *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. I. E. Liener (Ed.). New York, N. Y., Academic Press, 1980, p. 73.
8. Jaffé, W. G. & G. Camejo. La acción de una proteína tóxica, aislada de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*), sobre la absorción intestinal en ratas. *Acta Cientif. Venez.*, **12**:59-61, 1961.
9. Jaffé, W. G. & O. Brucher. Toxicidad y especificidad de diferentes fito-hemagglutininas de frijoles. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **22**:267-281, 1972.
10. Honavar, P.M., C. Shih & I.E. Liener. The inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutr.*, **77**:109, 1962.
11. Mancini, F. J. & F. M. Lajolo. Fatores anti-nutricionais em diferentes variedades de feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Ciência e Cultura*, **33**:94-97, 1981.
12. Kakade, M. L. & R. J. Evans. Growth inhibition of rats fed raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.*, **90**:191-198, 1966.
13. Liener, I. E. Protease inhibitors and other toxic factors in seeds. In: *Plant Proteins*. G. Norton (Ed.). 1978, p. 117.
14. Pusztai, A., E. M. W. Clarke, T. P. King & J. C. Stewart. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): Chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J. Sci. Food Agr.*, **30**:843-848, 1979.
15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & B. I. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275, 1951.
16. Kakade, M. I., N. Simons & I. E. Liener. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chem.*, **8**:518-526, 1969.
17. Lajolo, F. M. Inibidor de Amilase do *Phaseolus vulgaris*. Estudo Bromatológico. Tese de Livre Docência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 1977.
18. Dahlqvist, A. Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.*, **22**:99-107, 1968.
19. Fishman, W. H., S. Green & N. I. Inglis. Organ-specific behavior exhibited by rat intestine and liver alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **62**:163-175, 1962.
20. Adams, J. A. & J. Leichter. Effect of protein-deficient diets with various amounts of carbohydrate on intestinal disaccharidase activities in the rat. *J. Nutr.*, **103**:1716-1722, 1973.

21. Jaffé, W. G. & G. L. Vega Lette. Heat-labile growth inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.*, **94**:203-210, 1968.
22. Miller, D. & R. K. Crane. The digestive function of the epithelium of the small intestine. II. Localization of disaccharide hydrolysis in the isolated brush border portion of intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**:293-298, 1961.
23. Rouanet, J. M. & P. Besanção. Effects d'un extrait de phytohemagglutinines sur la croissance, la digestibilité, l'azote et l'activité de l'invertase et de la (Na^+ - K^+) - ATPase de la muqueuse intestinale chez la rat. *Ann. Nutr. Alim.*, **33**:405-416, 1979.
24. Olsnes, S., K. Refsnes & A. Pihl. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature*, **249**:627-631, 1974.