BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos

DIGESTIBILIDADE E PROPRIEDADES NUTRICIONAIS
DO FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.) E DE SUAS
PROTEÍNAS ISOLADAS

URSULA MARIA LANFER MARQUEZ

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. FRANCO M. LAJOLO

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
FCF/USP

São Paulo
1988

641.12
m357 di

11566

USP-CQ
641.12
M357di

Digestibilidade e propriedades nutricionais do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) e de suas proteínas I

11566-F

98

PREFÁCIO

O estudo da digestibilidade e das características bioquímicas do feijão, até há 20 anos, constituía campo de trabalho em que apenas alguns pioneiros se salientavam, dando-lhe a devida importância.

Com o desenvolvimento tecnológico surgiram novas "ferramentas" de trabalho e aperfeiçoaram-se outras pré-existentes, podendo-se assim verificar a complexidade do estudo bioquímico do feijão. Foram estudados os seus fatores antinutricionais, identificados os aminoácidos limitantes e ensaios em animais e humanos revelaram o seu potencial nutricional.

O Prof. Franco M. Lajolo acompanhou esta evolução internacional ao criar por volta de 1973, no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, uma linha de pesquisa voltada ao estudo do feijão.

Fomos introduzidos à recém-criada atividade, e desde então, recebemos a constante e eficiente orientação deste Mestre, podendo assim, serem implantadas técnicas analíticas e metodologias adequadas ao estudo bioquímico e nutricional do feijão e de outras leguminosas. Hoje com mais de uma dezena de teses apresentadas e inúmeros trabalhos científicos publicados, sob orien-

tação do Prof. Franco M. Lajolo, nos deparamos com a formação de um grupo de pesquisadores, definitivamente ligados ao "feijão".

Devemos, portanto, a nossa verdadeira formação profissional e universitária ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo, a quem dedicamos os nossos mais profundos agradecimentos.

A realização deste trabalho, no entanto, não teria sido possível, sem a colaboração dos Drs.: Siu Mui Tsai Saito, Reynaldo L. Victória, Paulo Trivelin e Francisco Krug do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP - Piracicaba), que nos orientaram em algumas etapas deste trabalho e nos auxiliaram na realização das análises isotópicas do ^{15}N e na determinação do enxofre químico.

Mencionam-se, contudo, os colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e em especial os professores Marilene De Vuono C. Penteado, Elizabete W. de Menezes e Maria Oriana Reyes Figueroa, por toda colaboração prestada.

Ressaltamos, também a colaboração amiga e estimuladora do Prof. W. Baltes, Professor Titular do Instituto de Química de Alimentos da Universidade Técnica de Berlim (Rep. Fed. da Alemanha) durante o desenvolvimento desta tese.

A Srta. Celly Akemi Donomai, a quem, por sua dedicação e presteza, colaborando nas análises químicas e biológicas, consignamos nosso reconhecimento.

Ao Dr. Eduardo A. Bulisani da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento desinteressado

do das sementes de feijão, nossos agradecimentos.

Ao Prof. Clôvis de Araujo Peres do Instituto de Matemática e Estatística, agradecemos o auxílio da interpretação estatística dos resultados.

À Srta. Moema Rodrigues dos Santos, bibliotecária da Biblioteca do Conjunto das Químicas - USP, agradecemos pela revisão e normalização das referências bibliográficas.

À Srta. Loanda d'Eurydice, eficiente e dedicada secretária, nossa gratidão.

A todos os que direta e indiretamente nos auxiliaram na realização do presente trabalho o nosso agradecimento.

A realização deste trabalho, no entanto, não foi apenas fruto da dedicação de diversas pessoas. Temos que mencionar o apoio financeiro da Fundação Volkswagen, da Rep. Fed. da Alemanha, da FINEP, (Financiadora de Estudos e Projetos) e da ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação).

Finalmente, e acima de tudo, permanece a inesquecível lembrança do constante incentivo demonstrado pelo meu marido, Gerardo, o apoio da minha mãe, e a paciência dos meus filhos, André, Tânia e Fábio. A eles, ofereço esta tese.

Í N D I C E

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	3
3 - OBJETIVOS	18
4 - PLANEJAMENTO	19
5 - MATERIAL	21
5.1 - Feijão	21
5.2 - Enzimas,	21
5.3 - Reagentes	22
5.4 - Isótopos do nitrogênio e do enxofre	22
5.5 - Obtenção de feijões marcados com ^{15}N e ^{35}S ..	22
5.5.1 - Assimilação de compostos nitrogenados e sulfurados pela planta de feijão ..	22
5.5.2 - Condições experimentais para a marca- ção dos feijões	24
5.6 - Animais	26
5.7 - Rações experimentais	26
5.8 - Tratamento térmico (Cocção)	27
6 - MÉTODOS	28
6.1 - Físico-Químicos e Químicos	28
6.1.1 - Preparo das amostras	28
6.1.2 - Determinação da proteína	28
6.1.3 - Determinação dos carboidratos	29

BIBLIOTECA
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Universidade de São Paulo

	pág.
6.1.4 - Determinação da fibra dietária	29
6.1.5 - Extração e fracionamento das proteínas	29
6.1.6 - Determinação do enxofre total	31
6.2 - Bioquímicos	31
6.2.1 - Atividade do inibidor da tripsina	31
6.2.2 - Atividade inibidora sobre a α -amilase.	32
6.2.3 - Atividade hemaglutinante	32
6.3 - Isotópicos	32
6.3.1 - Determinação do enriquecimento com ^{15}N	32
6.3.2 - Determinação da radioatividade do ^{35}S	33
6.4 - Biológicos: ensaios em animais	34
6.4.1 - 1a. Experiência: Utilização biológica das frações protéicas isoladas do feijão (albuminas, globulina G1 e glutelinas)	34
6.4.2 - 2a. Experiência: Aproveitamento nutricional do feijão integral, e do feijão adicionado da fração albumínica	36
6.4.3 - 3a. Experiência: Ensaio das rações marcadas isotopicamente. Efeito do feijão e de suas proteínas isoladas na perda de nitrogênio e enxofre fecais..	37
6.5 - Estatísticos	41
7 - RESULTADOS	42
7.1 - Extração e fracionamento das proteínas do feijão	42
7.2 - Enriquecimento isotópico das proteínas do feijão	44
7.3 - Ensaio em animais	45
7.3.1 - Digestibilidade e Valor Nutricional ..	45
7.3.2 - Ensaio biológico do feijão integral, albuminas e globulina G1, marcados isotopicamente	49

	pág.
7.3.3 - Efeito do feijão integral, da fração al- bumina e da globulina G1 na perda de nitrogênio	50
7.3.4 - Efeito do feijão integral e das fra- ções protéicas isoladas na excreção de enxofre	52
8 - DISCUSSÃO	60
8.1 - Propriedades nutricionais do feijão e digesti- bilidade de suas frações protéicas	60
8.2 - Efeito do feijão integral, das albuminas e da globulina G1, na perda de nitrogênio total e nitrogênio-15	70
8.3 - Efeito do feijão integral, das albuminas e da globulina G1 na eliminação de enxofre	78
9 - CONCLUSÕES	86
10 - RESUMO/SUMMARY	88
11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
12 - APÊNDICE: Lista de figuras, tabelas e quadros	108

1 - INTRODUÇÃO

Enquanto a produção e utilização de leguminosas na Europa, Oceania e Rússia se situam bem abaixo do seu potencial, elas constituem hoje em dia, um importante alimento protéico de origem vegetal, sendo difundidas especialmente na América, Ásia, Índia e África, onde o suprimento das necessidades protéicas geralmente não é coberto pelas "proteínas de alto valor biológico".

As leguminosas incluem segundo os dados mais recentes, cerca de 740 gêneros e 16.000 a 19.000 espécies. Entretanto, apenas 20 espécies são utilizadas comumente como gênero alimentício. Entre estas os feijões, representados pelo gênero *Phaseolus*, se destacam pela sua grande aceitação (Kantha & Erdman Jr., 1987). O consumo diário de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) aqui no Brasil, é bastante elevado, situando-se ao redor de 60 gramas "per capita", e devido ao seu elevado teor protéico (em torno de 25%), é capaz de suprir, em grande parte, as necessidades protéicas e energéticas da população, principalmente das classes sócio-econômicas menos favorecidas.

Durante os últimos 20 anos, muitos esforços tem sido feitos para suprir adequadamente as necessidades de proteínas. Iniciou-se um significativo aumento na produção de cereais como

também de leguminosas, e reconheceu-se experimentalmente que as proteínas de leguminosas, deficientes em aminoácidos sulfurados, são complementadas pelas proteínas de cereais, quando ingeridas em determinadas proporções.

(Apesar desses aspectos favoráveis, diversos fatores limitam a qualidade nutricional das leguminosas. O reduzido valor biológico dos feijões tem sido atribuído à baixa digestibilidade de suas proteínas, aliada à deficiência de aminoácidos sulfurados, bem como à presença de fatores antifisiológicos, tais como as antitripsinas e fitohemaglutininas, entre outros, variáveis quali e quantitativamente.)

Extensas revisões sobre a importância biológica dessas substâncias indesejáveis e a sua inativação por um tratamento térmico adequado, deixaram claro que esses fatores já descritos, não são os únicos responsáveis pela baixa utilização biológica. Por outro lado, vários pesquisadores sustentam a hipótese da reduzida digestibilidade estar relacionada com uma maior excreção de nitrogênio de origem metabólica, falseando os dados relativos à absorção de nitrogênio, determinada através de métodos convencionais de análise química.

O trabalho procurou explorar este ângulo da pesquisa, trazendo informações sobre a digestibilidade real do feijão e de suas principais frações protéicas.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Digestibilidade e valor biológico do feijão

Estudos em animais situam a digestibilidade das proteínas do feijão ao redor de 70-80%, mesmo após um aquecimento apropriado (Bressani e Elías, 1984; Durigan et al., 1987; Evans & Bauer, 1978; Hernandez-Infante et al., 1979). Esses estudos no homem, revelaram uma digestibilidade ainda menor daquela encontrada em animais (Bressani et al., 1982; Navarrete & Bressani, 1981), acompanhada de uma elevada excreção fecal de nitrogênio (Calloway & Kretsch, 1978; Graham et al., 1979).

O reduzido valor biológico e nutricional dos feijões tem sido atribuído tanto à deficiência em aminoácidos sulfurados, como à presença de fatores antifisiológicos. A importância dos inibidores de proteases e amilases, hemaglutininas e fatores de flatulência, foi amplamente revista na literatura científica (Jaffé, 1980; Lajolo, 1977; Laskowski & Kato, 1980; Richardson, 1980-1981; Gallaher & Schneeman, 1984; Liener, 1986; Menezes & Lajolo, 1987; Reddy et al., 1984).

Embora o tratamento térmico inative uma boa porcentagem dessas substâncias indesejáveis, o coeficiente de digestibilidade das leguminosas permanece reduzido, sugerindo haver ou-

tros fatores envolvidos com a baixa utilização biológica.

Alguns autores atribuíram a reduzida digestibilidade do feijão ao conteúdo em taninos e compostos fenólicos existentes na casca, por serem termorresistentes e capazes de se ligarem a proteínas ou a outros componentes da semente, formando complexos indigeríveis "in vitro" (Artz et al., 1987; Aw & Swanson, 1985; Laurena et al., 1986) e mesmo "in vivo" (Bressani et al., 1977; Bressani et al., 1982; Deshpande & Pradesh, 1986; Elias et al., 1979; Ronnencamp, 1977). Outra possibilidade é a da inibição direta de enzimas digestivas, pela ação de substâncias fenólicas (Fernandez, 1978; Griffiths & Moseley, 1980; Singh, 1984). Já em 1950, Jaffé, encontrou valores de 76,8, 79,5 e 84,1% para a digestibilidade do feijão (Phaseolus vulgaris, L.) preto, vermelho e branco respectivamente, relacionando o decréscimo da digestibilidade com o aumento no conteúdo de compostos fenólicos e com a cor.

(Bicudo, em 1978, relatou que a remoção da casca do feijão, anteriormente à cocção, aumentava significativamente a digestibilidade e a sua utilização protéica líquida em ensaios realizados com ratos.)

Os valores dessas variáveis passaram respectivamente de 66,7 para 76,0 e de 45,1 para 60,0. Da mesma forma, a adição da casca de feijão à dietas de caseína afetou negativamente a sua utilização, diminuindo também a digestibilidade. No entanto, a remoção de 90% dos compostos polifenólicos presentes na casca, através de extrações sucessivas, e a adição dessas cascas à dietas de caseína, não mostrou o efeito benéfico espe-

rado, sugerindo o autor, que esse mecanismo não seria o único responsável pela reduzida digestibilidade.

Vários autores relacionaram o reduzido aproveitamento biológico dos feijões, não somente com a baixa digestibilidade das proteínas, mas especificamente com a reduzida digestibilidade e biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais. Informações sobre a biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados são escasas: em feijões da espécie Vicia faba por exemplo, a digestibilidade "verdadeira" da cisteína (52-66%) foi consideravelmente inferior a do nitrogênio (79-83%) sendo a medida feita através da recuperação do aminoácido ao nível do segmento íleo-intestinal em porcos (Ivan & Bowland, 1976). O efeito benéfico causado pela suplementação das proteínas de feijão com aminoácidos sulfurados e outros aminoácidos limitantes, tem sido demonstrado por vários pesquisadores (Antunes et al.; 1979; Bressani & Elias, 1976; Bressani et al., 1963; Hernandez-Infante et al.; 1979; Moraes e Santos & Dutra de Oliveira, 1972; Sgarbieri & Whitaker, 1982).

Em 1978, Evans & Bauer confirmaram a reduzida utilização dos aminoácidos sulfurados e mostraram, através de uma técnica de balanço metabólico, que os animais absorvem 50% da metionina e 41% da cisteína provenientes do feijão, sendo porém a metionina suplementar adicionada, totalmente absorvida.

Sgarbieri et al. (1979), Antunes & Sgarbieri (1979) e Durigan et al., (1987) atribuem à metionina uma disponibilidade biológica ainda menor, mas variável em função da variedade do feijão, do tempo e das condições de armazenamento.

Recentemente, Sarwar & Peace (1986) também demonstra-

ram que a digestibilidade de aminoácidos limitantes em feijões, ervilhas e lentilhas era consideravelmente inferior à digestibilidade do nitrogênio total, recomendando que a digestibilidade da proteína não fosse tomada como indicador da biodisponibilidade de todos os aminoácidos essenciais, indistintamente.

2.2 - Química das frações protéicas do feijão

As proteínas de leguminosas são de natureza complexa e assumem funções de reserva, metabólicas ou estruturais. Através de técnicas de isolamento e fracionamento, baseados em diferenças de solubilidade, identificaram-se dois tipos de globulinas, consideradas as principais proteínas de reserva do feijão. A globulina G1, solúvel em soluções salinas de concentração elevada (NaCl 0,5M) e a globulina G2, solúvel mesmo em concentrações salinas muito reduzidas (Sun & Hall, 1975).

A fração globulínica predominante no feijão, tem sido referida na literatura por várias denominações: globulina G1, glicoproteína II, phaseolina, vicilina, componente α e por fração E, gerando certa confusão (Barker et al., 1976; Derbyshire et al., 1976; McLeester et al., 1973; Pusztai & Watt, 1970; Ishino & Ortega, 1975; Seidl et al., 1969). Apesar das diferenças encontradas nessas preparações, elas parecem possuir a mesma identidade e serão referidas por nós, daqui em diante, pelo termo globulina G1, como descrita originalmente por McLeester et al., 1973 e Sun & Hall (1975).

A fração albumínica, solúvel em água se constitui nu-

ma mistura, incluindo proteínas com atividade enzimática, fatores antinutricionais e possivelmente componentes com função de reserva. Schroeder (1984) relata que as albuminas presentes nos cotilédones de ervilhas são degradadas durante a germinação da semente, possuindo portanto uma função de reserva, similar à das globulinas. Esta fração tem sido encontrada no feijão em concentrações variáveis, de 14 a 31% da proteína total (Lanfer Marquez & Lajolo, 1981; Sathe & Salunkhe, 1981; Sgarbieri et al., 1979). Essas discrepâncias nos valores encontrados para a fração albumínica, foram atribuídas por Bhatti (1982) a contaminação cruzada de proteínas solúveis em água e em soluções salinas.

Nesse sentido, Desphande & Nielsen (1987a) julgam difícil uma quantificação do teor de albuminas "verdadeiras" em leguminosas, uma vez que mesmo a globulina G1 é parcialmente solubilizada em extrações com água, sendo a quantidade extraída, variável em função da variedade do feijão.

Além dessas três frações protéicas, foi descrita em feijões, a presença de outras, insolúveis em soluções salinas, como é o caso das glutelinas e prolaminas (Lanfer Marquez, 1979 e Ma, 1977).

Estudos relacionados com a composição de aminoácidos dessas frações protéicas, mostraram que as globulinas são deficientes em aminoácidos sulfurados, apesar dos teores encontrados terem sido discrepantes. A maior parte dos aminoácidos sulfurados presentes no feijão, parece estar concentrada na fração albumínica, que engloba também a maioria dos fatores antinu

tricionais (Barker et al., 1976; Bradbear & Boulter, 1984; Chang & Satterlee, 1981; Lanfer Marquez & Lajolo, 1981; Liener & Thompson, 1980). Em outras espécies, como é o caso do "Phaseolus mungo" por exemplo, Padhye & Salunkhe (1979) relataram um cômputo químico dos aminoácidos sulfurados de 64,0; 0,0; 56,0 e 70,7, para a albumina, globulina, prolamina e glutelina, respectivamente.

Esses resultados mostram no seu conjunto, haver uma predominância maior ou menor de aminoácidos sulfurados nas proteínas solúveis em água, apesar da problemática relacionada com a separação das frações protéicas, comentada anteriormente.

2.3 - Digestibilidade das frações protéicas isoladas "in vitro"

As possíveis diferenças na digestibilidade "in vitro" das frações protéicas isoladas do feijão, já foram assunto de diversos trabalhos. Assim a fração G1, proteína predominante no feijão, representando mais de 50% da proteína total (Romero et al., 1975), mostrou-se altamente susceptível à digestão por enzimas proteolíticas, após um tratamento térmico adequado (Bradbear & Boulter, 1984; Desphande & Nielsen, 1987b; Lanfer Marquez, 1979, Liener & Thompson, 1980; Romero & Ryan, 1978; Vaintraub et al., 1979).

Embora a maioria dos estudos tenha mostrado uma boa digestibilidade da globulina G1, Seidl et al. (1969), reporta-

ram que a fração globulínica do feijão preto (Ph. vulgaris), é resistente ao ataque enzimático por diversas enzimas proteolíticas, mesmo após o aquecimento. Vaintraub & Sayanova (1977) atribuem esse fato, à presença de teores significativos de inibidores de proteases, uma vez que o tratamento térmico foi relativamente brando (solução protéica a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, em banho-maria fervente). Trabalhos recentes, realizados por Desphande & Nielsen (1987b, e c) evidenciaram uma efetiva hidrólise "in vitro" da phaseolina ou fração G1, aquecida, por diversas enzimas proteolíticas inespecíficas num prazo de apenas 30 minutos, levando à formação de polipeptídeos de baixo peso molecular. Por outro lado, a hidrólise, dessa proteína "in vitro" por tripsina e quimotripsina é grandemente influenciada pela proporção enzima : substrato e pela presença de inibidores enzimáticos termorresistentes.

Enquanto a literatura é mais ou menos concordante em relação à elevada digestibilidade da globulina G1 do feijão, os resultados relacionados com a fração albumínica tem evidenciado um comportamento variável frente à ação de enzimas proteolíticas.

Sathe et al. (1982), trataram frações protéicas isoladas do "Great Northern bean" com uma combinação de peptidase, tripsina e alfa-quimotripsina, medindo a liberação de grupos amínicos com TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico). A digestibilidade das proteínas da farinha do feijão, albuminas, globulinas, concentrado protéico e isolado protéico sem aquecimento foi baixa, da ordem de 9,30; 2,73; 10,09; 13,60 e 28,59%, respectivamente. O aquecimento a seco elevou a digestibilidade para

68,58; 24,05; 29,67; 24,05 e 34,31% respectivamente, tendo os autores conseguido valores mais elevados com o aquecimento por via úmida.

Ao contrário dos resultados encontrados por Sathe et al. (1982), Lanfer Marquez & Lajolo (1981) trataram as frações protéicas isoladas de feijão (albuminas, globulina G1, globulina G2 e glutelinas) com tripsina, pancreatina e pepsina seguida de pancreatina; verificaram que o aquecimento elevava a liberação de alfa-amino grupos, tanto nas globulinas como nas glutelinas; porém a fração albumina aquecida, era formada de agregados de alto peso molecular, apresentando uma digestibilidade inferior em relação à albumina nativa. A explicação encontrada foi de um impedimento estérico ou de um bloqueio de resíduos de aminoácidos dificultando a ação enzimática, sendo que a possibilidade do envolvimento de fenóis ou quinonas, livres ou complexadas com a proteína, não podia ser excluída. De fato, agregados de alto peso molecular eram formados pelo aquecimento, não penetrando no gel de poliacrilamida. Peptídeos com um peso molecular de 14.000 a 20.000 permaneciam no resíduo, após a digestão da albumina autoclavada. Estes resultados estão de acordo com a reduzida biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados, já comentada anteriormente.

Desphande & Nielsen, em 1987c, examinaram, por eletroforese em gel de poliacrilamida, sódio-dodecilsulfato, a hidrólise enzimática de extratos de feijão integral e das proteínas solúveis em água e soluções salinas, de 11 cultivares de Ph. vulgaris. A hidrólise do feijão integral era dependente da

variedade, mas altamente influenciada pela razão proteína:enzima. A fração globulina era fácil e completamente hidrolisada, e a fração solúvel em água, apresentou após o tratamento térmico, um comportamento semelhante ao descrito por Lanfer Marquez e Lajolo (1981) onde durante o aquecimento foram formados agregados protéicos de peso molecular muito elevado, incapazes de serem degradados pela tripsina.

2.4 - Ensaio biológico das frações protéicas isoladas

Enquanto a digestibilidade "in vitro" é regularmente citada pela literatura científica, poucos são os trabalhos relatando ensaios biológicos com proteínas isoladas do feijão, e destes, a maioria se refere apenas à globulina Gl.

Apesar da boa digestibilidade da fração globulínica aquecida (92,5%), levemente inferior à da caseína (95,1%), Lienner & Thompson (1980), observaram um reduzido crescimento de ratos quando alimentados com essa fração. Além deste estudo "in vivo", conduzido durante 4 semanas, outros autores observaram também a sua elevada digestibilidade (Bradbear e Boulter, 1984; Navarrete & Bressani, 1981; Vaintraub et al., 1979). Apenas Pusztai e Palmer (1977) relataram que uma globulina isolada de feijão, isenta de lectinas, não inibia o crescimento de ratos. Esta conclusão, no entanto, se baseou em experimentos, nos quais a globulina Gl era acrescentada num teor de apenas 0,5% a uma dieta de caseína (5%).

Antunes & Sgarbieri (1980) em ensaios com animais, obtiveram reduzido aproveitamento biológico de extratos proteícos totais, albuminas e globulinas.

Outros (Sgarbieri et al., 1982), relataram que a fração G1 não aquecida, oferecida a ratos em jejum, através de uma dose única por intubação, era digerida em 80-90%. No entanto, ocorria uma produção aumentada de secreções intestinais contendo um teor relativamente elevado de nitrogênio. Este nitrogênio não reabsorvido, reduzia então a digestibilidade aparente da fração G1 para 35%.

Na verdade, pouco se sabe sobre as razões do reduzido valor biológico da globulina G1. Uma das causas está relacionada com a deficiência em aminoácidos sulfurados. Apesar da elevada digestibilidade "in vitro", a ingestão da globulina aquecida é capaz de provocar além do reduzido crescimento, uma hipertrofia pancreática nos animais, geralmente observada na presença de proteína não digerida. Uma explicação alternativa seria supor uma perda de proteína de origem endógena na forma de enzimas pancreáticas.

2.5 - A secreção e excreção de nitrogênio endógeno

A reduzida "digestibilidade aparente" de leguminosas, observada "in vivo" tanto em animais como humanos, além das causas citadas anteriormente, pode ter uma explicação alternativa, através de um aumento da secreção de nitrogênio endógeno,

estimulado por algum mecanismo ainda não totalmente elucidado (Slump & Van Beck, 1975; Costa de Oliveira & Sgarbieri, 1986b).

Diversos trabalhos falam a favor dessa hipótese. Amostras contendo elevados teores de nitrogênio endógeno, coletadas no intestino de ratos, foram observados por Nasset e Ju (1961), Nasset (1972) e Koehler et al. (1984). Estas secreções endógenas são de digestão mais lenta do que as proteínas da dieta estendendo-se a sua hidrólise ao longo do trato gastrointestinal (Partridge et al., 1985) causando uma significativa diluição do nitrogênio da dieta pelo nitrogênio endógeno.

Na verdade, esse efeito pode ser causado tanto por uma secreção pancreática aumentada, após a ingestão de proteínas de leguminosas (Green & Nasset, 1983) como por algum mecanismo que impede a reabsorção desse nitrogênio endógeno.

A excreção de nitrogênio endógeno, na forma de enzimas digestivas, descamações da mucosa intestinal e bactérias da flora intestinal, dificulta a interpretação dos resultados da análise do nitrogênio fecal. A denominada "digestibilidade aparente" ignora o nitrogênio metabólico presente nas fezes e não representa um índice adequado para estimar a digestibilidade verdadeira da proteína. Por outro lado, a "digestibilidade de real" pelo método clássico de Mitchell (1924), avalia o nitrogênio endógeno, através da excreção de nitrogênio de um grupo paralelo de animais sob dieta aprotéica. No entanto, esta correção nem sempre é adequada, pois parece haver influência da natureza do alimento e da concentração protéica ingerida, na taxa de excreção endógena.

Segundo Mitchell e Bert (1954) a proteína isolada, não exerce um efeito significativo, sendo o nitrogênio endógeno excretado, normalmente reduzido, e da ordem de 3mg/rato de 50g/dia. No entanto, baseado na literatura, parece haver uma correlação entre a concentração de componentes indigeríveis e não-nitrogenados da ração, com o nível de excreção de nitrogênio endógeno, como veremos.

Krawielitzki e cols., em estudos sucessivos empregando isótopos, demonstraram haver um aumento do nitrogênio endógeno, proporcional à ingestão de proteína. As dietas oferecidas aos animais, por estes autores, consistiam, no entanto, de cevada, levedura e soja, e não de proteínas isoladas. Assim, por exemplo, a ingestão de 100mg N/dia proveniente de uma ração a base de leveduras causou em ratos, um excreção de nitrogênio endógeno de 16,62mg N/dia. Animais alimentados com 200, 300 e 400mg N/dia, tiveram uma participação do nitrogênio endógeno maior, da ordem de 17,37, 25,41 e 35,26mg N/dia, respectivamente - (Krawielitzki & Bock, 1976; Krawielitzki & Tim, 1978; Krawielitzki et al., 1981).

Zebrowska e Low (1987), estudando a variação da secreção pancreática exócrina em função do tipo e da quantidade de fibra dietária, concluíram a fração não celulósica da fibra ser responsável pelo aumento do volume da secreção pancreática.

Da mesma forma, alimentos ricos em compostos polifenólicos, devem ser vistos com cautela, por serem capazes de elevar a excreção de nitrogênio de origem endógena (Tamir e Alu-mot, 1970).

Outros estudos relacionaram a elevada excreção de nitrogênio com um aumento da proliferação bacteriana. Na verdade, este efeito não é específico para os feijões, mas parece ocorrer com outras dietas, ricas em polissacarídeos não-digeríveis (Salter, 1983, Liebert & Gebhardt, 1986). A literatura concernente indica que a atividade microbiana, e paralelamente, a retenção de nitrogênio, são influenciadas pelo tipo e teor de carboidratos, bem como pelo teor de fibra presente na dieta. No entanto, os efeitos de carboidratos indigeríveis sobre a excreção de nitrogênio endógeno e o seu envolvimento com a síntese protéica microbiana são complexos e ainda não podem ser generalizados, necessitando de mais estudos (Dreyer & van der Walt, 1984; Kreuzer & Kirchgessner, 1985).

Costa de Oliveira & Sgarbieri (1986a), mostraram que ratos injetados com ^{14}C -glicina e alimentados por 4 dias com caseína, feijões cozidos ou crus, excretaram 2, 5 e 10 vezes mais radioatividade e N endógeno, respectivamente, em relação àqueles que ingeriram a ração aprotéica. O cálculo da quantidade de N endógeno foi baseado na premissa de haver uma marcação isotópica semelhante entre o N endógeno excretado a partir das rações experimentais e a ração aprotéica.

Em outro trabalho, Costa de Oliveira & Sgarbieri (1986b) utilizando feijão integral e o seu extrato protéico total autoclavados, verificaram que as digestibilidades e os valores biológicos calculados a partir do balanço entre o ^{15}N ingerido e excretado eram superiores àqueles baseados no balanço do N total.

Por outro lado, Bender e Mohammadiha (1981) e Sandaradura e Bender (1984), acreditam que as elevadas excreções de DNA e nitrogênio, observadas em ratos alimentados com feijões cozidos, se devem a um aumento no "turnover" das células da mucosa intestinal. Esta afirmação foi baseada na determinação do número de bactérias fecais viáveis e na contagem do número de mitoses celulares nas criptas intestinais de ratos, após injeção intraperitoneal de colchicina. No entanto, a medida do "turnover" da timidina-³H realizada por outros autores (Fairweather-Tait et al., 1983) mostrou que a alimentação de ratos com feijões cozidos provocava apenas um moderado aumento da descamação das células da mucosa, atribuindo o efeito da elevada excreção fecal não somente à um aumento na descamação da mucosa intestinal mas também à presença de carboidratos indigeríveis, que por sua vez podem incrementar a excreção de N por via endógena.

Resultados concordantes com uma reduzida contribuição da descamação celular foram descritos anteriormente por Da Costa et al. (1971), mostrando que apenas 8-15% da proteína secretada pelo intestino delgado, são provenientes de descamação celulares.

Parece que o nitrogênio fecal é um complexo representado por nitrogênio de origem exógena e endógena em proporções variáveis, dificilmente determinadas, podendo a sua composição e estrutura serem modificadas significativamente pela ação da flora microbiana intestinal (Souffrant et al., 1986).

As informações apresentadas, permitiram supor que a

reduzida utilização biológica do feijão poderia estar relacionada diretamente com a resistência à digestão de algumas das frações protéicas "per si" ou a um complexo resultante da interação dessas frações com outros componentes do feijão durante o cozimento. Nesse contexto parecia importante também, determinar quanto do nitrogênio fecal era proveniente da proteína do feijão e quanto tinha origem indireta ou endógena.

3 - OBJETIVOS

A investigação aqui relatada teve como objetivos específicos:

- 3.1 - Determinar a digestibilidade e a utilização biológica do feijão e de suas frações protéicas isoladas em ensaios com ratos.
- 3.2 - Avaliar, através do emprego de proteínas marcadas, a contribuição do nitrogênio e enxofre de origem endógena, nas perdas fecais causadas pela ingestão do feijão ou de suas frações protéicas.

4 - PLANEJAMENTO

O planejamento proposto a seguir foi desenvolvido em várias etapas sucessivas, no sentido de se poder obter informações de complexidade crescente sobre a digestibilidade do feijão e de suas principais frações protéicas.

Inicialmente, procedemos à extração e isolamento das principais frações protéicas do feijão (albuminas, globulina G1 e glutelinas). A seguir foram realizados os ensaios biológicos em ratos, com a finalidade de avaliar a digestibilidade do feijão integral bem como de cada uma das frações protéicas isoladas, visando explicar algumas de suas propriedades nutricionais. A análise e interpretação dos resultados assim obtidos, foram realizados primeiramente através de metodologia convencional, baseada nos ganhos de peso e na razão entre o nitrogênio ingerido e excretado por via fecal. Mas, só por esse "balanço" seria difícil determinar a origem do material fecal, pois não são reconsiderados aí, os processos metabólicos de absorção e secreção inerentes à fisiologia do aparelho gastro-intestinal, os quais alteram significativamente a sua composição. Daí, planejamos utilizar "material marcado" como técnica mais específica, nos ensaios biológicos em ratos.

Foram, então, utilizados feijões marcados isotopica-

mente através da marcação das suas proteínas com nitrogênio-15 e enxofre-35. Após a colheita destes feijões marcados e do isolamento das suas principais frações protéicas, essas foram ensaiadas em ratos, agrupados de acordo com a dieta recebida. Um grupo recebeu o feijão integral, outro a fração albumina e um terceiro a fração globulina G1. Incluímos ainda dois grupos controles: um com caseína e outro aprotéico.

Essa metodologia permitiu obter, assim, informações sobre a origem do nitrogênio-15 e do enxofre-35 excretados, podendo assim diferenciar sua origem, se endógena ou exógena.

5 - MATERIAL

5.1 - Feijão

Estudamos sementes da variedade Carioca, espécie Phaseolus vulgaris, L. provenientes da Estação Experimental do Instituto Agronômico de Campinas, SP, onde foram cultivadas em condições controladas.

5.2 - Enzimas usadas

Tripsina de pâncreas bovino (tipo III, 2 X cristalizada), Pancreatina de pâncreas de porco (grau VI, 4 X NF), e Pepsina de mucosa de estômago de porco (P7012) da Sigma Chemical Co. Alfa-Amilase termoestável - Termamyl-120L da Novo Industri AS.

Amilase salivar (1,4-alfa-D-glucano hidrolase EC 3.2.1.1) foi obtida de saliva humana, purificada por precipitação fracionada com acetona, de acordo com a técnica descrita por Finardi Filho & Lajolo (1982).

5.3 - Reagentes

Albumina sérica bovina (2 X cristalizada), BAPA (benzoilarginina-p-nitroanilida), ácido 3,5, di-nitrosalicílico , POPOP (1,4-di-2-(5-feniloxazol) benzeno, PPO (2,5 difeniloxazol) foram obtidos da Sigma Chemical Co.; naftaleno da Merck; etilenoglicol da Baker; os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.4 - Isótopos do nitrogênio e do enxofre

O cloreto de amônio enriquecido com nitrogênio-15 (10,5 átomos % de ^{15}N) foi produzido e cedido gentilmente pelo CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP, Piracicaba, SP).

O sulfato de sódio radioativo (^{35}S) de pureza isotópica de no mínimo 99,99%, livre de carregador, foi adquirido do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) São Paulo.

5.5 - Obtenção de feijões marcados com ^{15}N e ^{35}S

5.5.1 - Assimilação de compostos nitrogenados e sulfurados pela planta de feijão.

Embora não fosse o escopo central deste trabalho, es-

tudar a metabolização de compostos nitrogenados e sulfurados no feijoeiro, achamos interessante citar alguns resultados obtidos por vários autores sobre a sua fisiologia.

Durante a germinação da semente e após a exaustão do nitrogênio de reserva, a planta depende das raízes para a obtenção de nitrogênio, na forma de NO_3^- ou NH_4^+ do solo, ou de NH_4^+ proveniente da fixação de nitrogênio nos nódulos radiculares. O crescimento da planta obriga o vegetal a transportar o nitrogênio aos órgãos em formação, e posteriormente às sementes, devendo ser incorporado numa forma orgânica para prevenir a sua ação tóxica (Mifflin, 1980).

A maioria das informações sobre os mecanismos de transporte do nitrogênio, foram obtidas pela análise do exsudato coletado de raízes e caules cortados.

Leguminosas noduladas, podem ser classificadas em dois grupos com relação ao seu mecanismo de assimilação e transporte de nitrogênio. Nas leguminosas de clima temperado, tais como "alfafa" e "tremoço" o nitrogênio é transportado principalmente através de amidas (asparagina e glutamina), enquanto que nas leguminosas de origem tropical, incluindo o feijão Phaseolus vulgaris, L., ocorre a assimilação e transporte do nitrogênio através de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) (Triplett, 1986). Este mecanismo, em soja e "cowpea" (Vigna unguiculata, L.) parece ser responsável pelo transporte de mais de 90% do nitrogênio, sendo estas substâncias utilizadas como substrato para a síntese protéica em órgãos aéreos da planta (Herridge et al., 1978; Schubert, 1981).

Quanto à assimilação e metabolização do enxofre, o sulfato parece ser a fonte mais frequente para a síntese de compostos sulfurados essenciais, entre eles; a cisteína, a metionina e a glutathione (Mifflin, 1980).

Os vegetais absorvem o sulfato pelo sistema radicular, sendo transportado através do xilema até os órgãos clorofilados, onde é reduzido e incorporado em L-cisteína numa reação luz dependente. A L-cisteína representa o principal precursor de outros compostos sulfurados, sendo os aminoácidos, portadores de 90% do enxofre total da planta (Mifflin, 1980).

5.5.2 - Condições experimentais para a marcação dos feijões

Para a realização dos ensaios biológicos em ratos, foi necessário obter uma quantidade suficiente de feijão marcado para se isolar as suas principais frações protéicas e incorporá-las nas rações para os animais.

Sementes de feijão contendo nitrogênio-15 e enxofre-35 foram obtidas através de uma marcação por via radicular, pela adição de soluções de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ à terra de cultivo.

Inicialmente foram feitos ensaios para se estabelecer as condições de marcação, as quais permitissem um enriquecimento satisfatório em ^{15}N e particularmente em ^{35}S por causa

da curta meia-vida desse isótopo (87 dias). Deve-se lembrar que na época da colheita ($\pm$ três meses após o plantio), a radioatividade do ^{35}S já havia decaído uma meia-vida.

Após essas experiências preliminares, estabelecemos a forma de marcação, que descrevemos abaixo.

Foi preparado um canteiro coberto de 105 x 390 x 15cm contendo terra roxa extruturada. Os feijões (Phaseolus vulgaris, L.) variedade Carioca foram semeados aos pares, com espaços de 10cm e em linhas distanciadas de 25cm. Contamos nesta fase com a colaboração do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, SP).

O plantio foi efetuado na época mais quente do ano, exigindo uma rega 2 vezes ao dia.

A adubação radicular realizada na época do plantio foi feita com uma solução 10,0% de NH_4Cl , contendo 10,5 átomos % de ^{15}N . Ao total foram aplicados uniformemente 67,5g de NH_4Cl .

Concomitantemente foram aplicados aproximadamente 0,5mCi de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, com uma pureza isotópica de no mínimo 99,99% diluídos em 2 litros de água destilada (concentração final de Na_2SO_4 na solução = 0,25 μmolar).

Na época pré-florescimento (5 semanas após o plantio) a adubação isotópica radicular foi complementada por uma adubação foliar, pulverizando-se em dias alternados aproximadamente 400ml de uma solução de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a 2% na 1ª aplicação e a 1% nas 5 aplicações subsequentes. Ao total foram aplicados 21,4g de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. A colheita das sementes secas, 15 semanas

após o plantio, forneceu 1000g de feijões.

A adubação com ^{15}N via radicular e por pulverização foliar, resultou em 0,526 átomos de ^{15}N em excesso no feijão integral, 1,124 átomo % de ^{15}N em excesso na fração albumínica e de 0,480% na fração globulina após mistura do feijão integral e da fração globulina com 50% da mesma fonte protéica, não marcada. Da mesma forma, a marcação com o isótopo radioativo enxofre-35 por via radicular, foi suficiente e acompanhou o teor de enxofre total em cada fração protéica, mantendo-se constante a relação entre o teor de enxofre total e a atividade do enxofre-35.

5.6 - Animais

Foram utilizados ratos machos ou fêmeas (Rattus norvegicus, var. albinus) da linhagem "Wistar", recém-desmamados, obtidos a partir de colônias mantidas no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com rações comerciais.

5.7 - Rações experimentais

As dietas para as experiências foram formuladas para conterem 10% de proteína, fornecida pela caseína (Grau farmacêutico - USP), pelas sementes de feijão ou pelas suas proteínas isoladas. A ração à base de caseína foi suplementada com 0,1% de DL-metionina. As dietas continham ainda, 8% de óleo de

soja, 4% de mistura salina, 1% de celulose, 1% de mistura vitamínica e amido suficiente para completar 100%. As misturas salinas e vitamínicas foram preparadas conforme as necessidades de ratos (Institute of laboratory animal resources, 1979). A adição de caseína, feijão integral ou proteínas isoladas do feijão era feita às expensas do amido.

5.8 - Tratamento térmico (Cocção)

Antes da sua incorporação na ração, os feijões inteiros foram autoclavados a 120°C durante 30 minutos após a adição de água na proporção 1:5 (feijão-água), secos juntamente com a água de cozimento em estufa ventilada a 45°C, durante 36h e moídos para passarem uma malha de 0,25mm de abertura. As frações protéicas isoladas foram autoclavadas em condições idênticas e liofilizadas.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

6 - MÉTODOS

6.1 - Físico-Químicos e Químicos

6.1.1 - Preparo das amostras

Tanto as sementes de feijões "frios" como as marcadas isotopicamente foram moídas em moinho de martelos (Lab. pulverizing Mill, Weber Bros & White Metal Works) até passarem uma malha de 0,25mm de abertura.

6.1.2 - Determinação da proteína

O nitrogênio total foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1975) utilizando-se (na conversão do nitrogênio em proteína) o fator 6,25 para as amostras biológicas e 5,7 para as demais (Sosulski & Holt, 1980). Nos extratos proteicos empregou-se ainda o método de Lowry et al. (1951).

6.1.3 - Determinação dos carboidratos

Foram dosados pelo método de Dubois et al. (1956), utilizando-se para o cálculo, uma curva padrão de glicose.

6.1.4 - Determinação da fibra dietária

A fibra dietária total, no feijão ou nas suas frações protéicas, foi determinada por via enzimática, de acordo com o método descrito por Asp et al. (1983). As análises diferiram do método descrito, apenas quanto ao agente de filtração, sendo a Celite substituída por lã de vidro.

6.1.5 - Extração e fracionamento das proteínas

- Extração aquosa

As albuminas foram extraídas de uma suspensão de 20g de farinha de feijão integral em 100ml de água destilada, por agitação, durante 1 hora à 4°C. Esta suspensão foi filtrada em gaze, centrifugada a 30.000g/30min e o sobrenadante dialisado contra água destilada por 48 horas e novamente contra água destilada e desmineralizada por mais 24 horas a temperatura de 0-4°C. Esta segunda diálise teve por finalidade promover a precipitação de globulinas que se solubilizaram pela presença de sais naturalmente existentes na semente do feijão. As so-

luções foram concentradas então em evaporador rotatório até a metade do seu volume inicial, liofilizadas e guardadas em congelador até o uso.

- Extração das globulinas

As globulinas foram extraídas e isoladas seguindo basicamente o método descrito por McLeester et al. (1973). Uma suspensão de 20g de farinha de feijão integral em 100ml de NaCl 0,5M contendo ácido ascórbico 0,25M, pH 2,2 foi extraída durante 1 hora à temperatura ambiente, filtrada em gaze e centrifugada a 23.000g/30min. O sobrenadante constituiu uma preparação bruta das globulinas. A partir deste extrato foi obtida a fração globulina G1 pela redução da força iônica do meio. A diluição do extrato com 5 vezes o seu volume de água destilada e deionizada, reduz a força iônica inicial de 0,5M para 0,08M, condição em que ocorre a precipitação da fração G1 (Sun & Hall, 1975). Este precipitado foi coletado por centrifugação a 23.000g/30min a 4°C.

- Extração das glutelinas

A fração glutelina foi obtida a partir do resíduo da extração das globulinas tendo-se utilizado para esta finalidade um feijão previamente descascado. 100g do resíduo, seco em estufa ventilada a 45°C, foram suspensos em 500ml de NaOH

0,1N e extraídas durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação; o extrato foi centrifugado a 23.000g/30min, o resíduo reextraído e os sobrenadantes combinados, constituíram a fra-ção glutelina. Esta solução foi ainda neutralizada e dializa-da, ocorrendo então a precipitação das glutelinas que foram recolhidas por centrifugação (30.000g/30min).

As três frações protéicas, albuminas, globulina G1 e glutelinas foram liofilizadas e congeladas até o uso.

6.1.6 - Determinação do enxofre total

Um sistema automático de injeção de reagentes em fluxos alternados, desenvolvido e descrito por Krug et al. (1983) foi empregado para a determinação turbidimétrica do sulfato. Todas as amostras (fontes protéicas, rações e fezes) foram dige-ridas como descrito em 6.3.2). As soluções resultantes foram injetadas e misturadas com cloreto de bário, para formar a susensão de sulfato de bário, cuja medida turbidimétrica foi efe-tuada em espectrofotômetro Varian G34, com unidade de alta sensibilidade REA-112, em comprimento de onda de 410nm.

6.2 - Bioquímicos

6.2.1 - Atividade do inibidor de tripsina

Empregamos o método descrito por Kakade et al. (1974),

medindo-se a redução da velocidade de ação da tripsina bovina sobre o BAPA, na presença do inibidor de tripsina.

6.2.2 - Atividade inibidora da alfa-amilase

Foi determinada, usando-se o método originalmente descrito por Bernfeld, adaptado por Lajolo & Finardi Filho (1984).

6.2.3 - Atividade hemaglutinante

A dosagem da atividade hemaglutinante foi efetuada essencialmente como descrito por Liener (1955) sendo a leitura final feita através de detecção visual da aglutinação após diluição seriada do extrato.

6.3 - Isotópicos

6.3.1 - Determinação do enriquecimento com ^{15}N

A abundância relativa do isótopo de massa ^{15}N foi determinada por espectrometria de massa. Para tal, o nitrogênio presente nas amostras foi oxidado a nitrogênio molecular, de acordo com o método de Dumas, modificado para a determinação do nitrogênio-15 (Proksch, 1969; Trivelin et al., 1973).

Mediu-se no espectrômetro de massa Varian Matt-230, a

intensidade das correntes iônicas correspondentes a massa 28 ($^{14}\text{N} - ^{14}\text{N}$) e massa 29 ($^{14}\text{N} - ^{15}\text{N}$). A relação entre essas correntes foi convertida em átomos % do isótopo.

A concentração expressa em átomo % de ^{15}N em excesso foi obtida, subtraindo-se a abundância natural do ^{15}N (0,365%) dos valores calculados de átomos % de ^{15}N .

6.3.2 - Determinação da radioatividade do ^{35}S

A contagem da atividade do ^{35}S foi determinada após a digestão de 350mg das amostras (fontes protéicas, dietas preparadas e fezes) com ácido nítrico e perclórico, em bloco digestor Tecnal, de acordo com a técnica descrita por Krug et al. (1977). As soluções límpidas, resultantes da digestão, foram diluídas com água destilada e deionizada para um volume final de 35ml. Amostras com um peso inferior a 350mg foram digeridas e diluídas com volumes proporcionais.

As contagens da radioatividade foram efetuadas no cintilador líquido Beckman LS 100C adicionando-se 100 μ l da amostra a 10ml da solução cintiladora, segundo Bray (1960). As amostras foram contadas por um tempo suficiente para se obter um erro estatístico inferior a 2%. Foi preparada uma curva de padrões com radioatividade conhecida, e, para se obter uma correção do "quenching" adicionou-se a esses padrões amostras das fontes protéicas, dietas e fezes não marcadas, igualmente digeridas e diluídas medindo-se a redução na contagem dos padrões.

A eficiência do contador (0,45) foi determinada comparativamente com outro de eficiência conhecida.

Os resultados foram expressos em dpm (desintegrações por minuto), calculados a partir das contagens por minuto e da eficiência de contador.

$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm}}{\text{eficiência do contador}}$$

6.4 - Biológicos: ensaios em animais

6.4.1 - 1a. Experiência: Utilização biológica das frações protéicas isoladas do feijão (albuminas, globulina G1 e glutelinas)

O ensaio de 7 dias de duração foi realizado, para avaliar a digestibilidade e o aproveitamento biológico das frações protéicas isoladas (albuminas, globulina G1, glutelinas) e comparando-se os resultados com os índices obtidos a partir de uma ração controle de caseína, contendo o mesmo teor protéico (10%). Todas as frações protéicas do feijão foram autoclavadas durante 30 min a 121°C, liofilizadas e incorporadas nas rações. Os animais (6 ratos Wistar, machos por grupo; peso médio inicial = 38,5g) foram alojados em gaiolas metabólicas individuais. A coleta de fezes foi iniciada 24 horas após a administração das rações, feita em intervalos de 24 horas e terminada 1 dia após a última ingestão de

ração. As fezes foram secas em estufa ventilada a 90°C, e os resíduos de ração removidos, passando-se rapidamente um jato de água corrente pelas fezes que se encontravam numa peneira. A seguir as fezes foram secas novamente, a 90°C, até peso constante, moídas e guardadas em geladeira para as determinações analíticas. Um grupo de animais sob dieta aprotéica foi mantido paralelamente.

A digestibilidade das proteínas foi expressa de duas formas:

- Coeficiente de digestibilidade "aparente":

$$\text{C.D. "aparente"} = \frac{\text{N absorvido}}{\text{N ingerido}} \times 100$$

- Coeficiente de digestibilidade "real":

$$\text{C.D. "real"} = \frac{\text{N ingerido} - \frac{(\text{N fecal} - \text{N fecal aprotéico})}{\text{N ingerido}}}{\text{N ingerido}} \times 100$$

- O NPR (net protein ratio) (ou razão protéica líquida) foi calculado pela relação:

$$\text{NPR} = \frac{\text{G.P. teste} + \text{P.P. aprotéico}}{\text{P.I.}}$$

G.P. teste - ganho de peso dos animais alimentados com a ração contendo a proteína em estudo.

- P.P._{aprotéico} - perda de peso dos animais alimentados com a ração aprotéica.
- P.I. - proteína em estudo, ingerida.

6.4.2 - 2a. Experiência: Aproveitamento nutricional do feijão integral, e do feijão adicionado da fração albumínica

Examinou-se nessa experiência o efeito da suplementação do feijão integral com a albumina isolada, ao nível de 10% da albumina em relação a proteína do feijão integral, num ensaio biológico com ratos. Os feijões e a fração albumina foram autoclavados conjuntamente e preparadas as rações experimentais e controle, de forma semelhante ao experimento anterior, contendo um teor protéico de 10%. Os animais (6 ratos machos Wistar por grupo, peso médio inicial = 44g) foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas e receberam as duas rações experimentais e a ração controle "ad libitum". Paralelamente foi mantido um grupo de animais sob ração aprotéica. O controle de ganho de peso, consumo de ração e excreção fecal foi feito durante 13 dias.

6.4.3 - 3a. Experiência: Ensaio das rações marcadas isotopicamente. Efeito do feijão e de suas proteínas isoladas na perda de nitrogênio e enxofre fecais.

A partir dos feijões não marcados ou marcados com ^{15}N e ^{35}S foram obtidas as frações protéicas (albuminas e globulina G1) pela técnica já descrita anteriormente, e preparadas as rações para ratos, da forma descrita para os dois ensaios anteriores.

A fração glutelina, apesar de merecer mais estudos, não foi incluída, em virtude da preemência de tempo para o isolamento das proteínas e o seu ensaio em animais, uma vez que a meia-vida do enxofre radioativo é reduzida (87 dias).

Para uma melhor compreensão dos dados relativos ao conteúdo de nitrogênio e enxofre, e à marcação isotópica, apresentamos nas Tabelas 1 a 4 os teores de nitrogênio, nitrogênio-15, enxofre e enxofre-35, tanto para as três fontes protéicas (feijão integral, albuminas e globulina G1) bem como das rações preparadas.

Adotou-se o seguinte esquema experimental para o ensaio com ratas da linhagem Wistar, com peso médio inicial de 42g.

Seis animais em cada grupo (controle e experimentais) receberam durante três dias as rações não marcadas. Após este período de adaptação, o número de animais foi reduzido para quatro, que então passaram a receber do 1º ao 6º dia as rações

TABELA 1 - Teor de nitrogênio total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$), nas fontes protéicas e nas rações experimentais.

Fonte Protéica	%			
	Nitrogênio na fonte protéica	Fonte pro téica na ração	Nitrogênio na ração	Proteína na ração (N x 5,7)
Feijão integral	4,29*	40,89	1,77	10,08
	4,12**	42,57	1,64	9,35
Albuminas	11,46*	15,32	1,75	9,98
	11,31**	15,52	1,60	9,13
Globulina G1	15,38*	11,42	1,57	8,94
	16,92**	10,94	1,54	8,80
Caseína + 1% DL-metionina	12,34*	12,34	1,60	9,98***

Os valores analíticos representam a média de 3 determinações

* fonte protéica não marcada isotopicamente

** fonte protéica marcada com ^{15}N e ^{35}S

*** fator de conversão do N = 6,25

TABELA 2 - Teor de ^{15}N nas fontes protéicas e nas rações experimentais.

Fonte	Protéica	Átomos % de ¹⁵ N em excesso*		% de N total na ração	mg de ¹⁵ N em excesso/ /100gde ração	
		Resultado Analítico			Calculado a partir do ¹⁵ N da fon te protéica	Calculado a partir do ¹⁵ N da ra- ção
		Fonte Protéica	Ração			
Feijão integral*		0,526	0,493	1,641	8,63	8,09
Albuminas		1,124	1,076	1,602	18,01	17,24
Globulina G1*		0,480	0,498	1,544	7,41	7,69

Os valores analíticos representam a média de duas ou três determinações.

* abundância natural de ^{15}N = 0,365 átomos % de ^{15}N .

** após diluição com 50% de fonte protéica não marcada.

TABELA 3 - Teor de enxofre total nas fontes protéicas e nas rações experimentais.

Fonte Protéica	% enxofre na fonte protéica*	% fon- te protéi- ca na ração	% enxofre na ração	
			Calculado*	Analítico
Feijão integral	0,238 [±] 0,007	42,57	0,148	0,167 [±] 0,006
Albuminas	0,511 [±] 0,010	15,52	0,126	0,137 [±] 0,006
Globulina G1	0,240 [±] 0,000	10,94	0,069	0,087 [±] 0,005

Os valores analíticos representam a média de 3 determinações [±] desvio padrão.

* calculado a partir da % de enxofre na fonte protéica + % enxofre na ração aprotéica (0,047).

TABELA 4 - Atividade do ³⁵S nas fontes protéicas e nas rações experimentais.

Fonte Protéica	Atividade na fonte protéica dpm.10 ⁻⁴ /g	% Fonte protéica na ração	Atividade na ração dpm . 10 ⁻⁵ /100g	
			Calculado	Analítico
Feijão integral*	11,2	42,57	47,7	49,1
Albumina	44,4	15,52	68,9	71,4
Globulina G1*	10,7	10,94	11,7	11,73

Os valores analíticos representam a média de 3 determinações.

*após diluição com 50% de fonte protéica não marcada.

com proteína marcada, sendo que no 1º dia os animais receberam a ração por um período de 12 horas. Do 7º ao 11º dia os ratos voltaram a receber as rações não marcadas.

A água e o alimento foram oferecidos "ad libitum" e os animais mantidos em gaiolas metabólicas individuais. A coleta de fezes e urina foi iniciada 12 horas após a administração das rações marcadas e daí por diante, em intervalos de 24 horas, sendo terminada 24 horas após a última ingestão da ração. As fezes foram secas e tratadas como já descrito. O consumo de ração foi anotado diariamente durante todo o experimento.

6.5 - Estatísticos

Os resultados obtidos através dos ensaios biológicos foram submetidos à análise de variância. Em virtude das diferenças significativas encontradas, prosseguiu-se a análise de variância através das Comparações Múltiplas de Tukey (Neter et al., 1985).

7 - RESULTADOS

Inicialmente apresentamos os resultados das experiências, compreendendo a extração e purificação das proteínas do feijão (Phaseolus vulgaris, L.), enriquecidas ou não isotopicamente com ^{15}N e ^{35}S , seguidos dos resultados dos ensaios biológicos.

Esses ensaios, foram realizados primeiramente com as frações protéicas isoladas e aquecidas, porém não marcadas, na tentativa de identificar a fração ou frações responsáveis pela reduzida utilização biológica do feijão. Damos sequência ao estudo através de um ensaio biológico dos feijões e de suas proteínas marcadas, com a finalidade de se obter resultados que pudessem explicar o comportamento observado em trabalhos anteriores (Lanfer Marquez & Lajolo, 1981).

7.1 - Extração e fracionamento das proteínas do feijão

Com a metodologia adotada (descrita no item 6.1.5) foi possível obter as frações protéicas, através de extrações sucessivas de pequenos lotes de feijão.

A fração globulina G1 isolada, representando aproximadamente 50% das proteínas totais do feijão, mostrou em média após a sua liofilização, um teor de nitrogênio da ordem de 16%, que convertido, forneceu uma concentração de proteína em torno de 90%. O teor de carboidratos nesta fração foi aproximadamente de 12%.

A fração albumínica liofilizada, continha em média 11,4% de nitrogênio (65% proteína). Concentrações de nitrogênio superiores a esse valor foram observadas algumas vezes e relacionadas com uma maior contaminação cruzada pela globulina G2, solúvel mesmo em concentrações salinas muito reduzidas.

A fração albumínica obtida dessa forma, representa 16,5% da proteína total do feijão e está acompanhada de um elevado teor de carboidratos (30mg/100mg proteína).

A precipitação das proteínas dessa fração com ácido tricloroacético (concentração final 5%) mostrou que 1/3 desses carboidratos foram recuperados no precipitado, evidenciando possuir glicoproteínas ou açúcares ligados a outras macromoléculas ou ainda conter polissacarídeos de alto peso molecular.

A fração glutelina foi obtida a partir de feijão previamente descascado. Este procedimento tornou-se necessário, pois uma grande quantidade de pigmentos da casca seriam extraídos concomitantemente. Esta fração protéica constitui uma preparação bastante impura, com 10,4% de nitrogênio, necessitando no futuro uma caracterização química mais completa.

7.2 - Enriquecimento isotópico das proteínas do feijão

As sementes de feijão, marcadas com os isótopos durante o seu desenvolvimento, apresentaram um enriquecimento satisfatório, com uma concentração de 1,052 átomos % de ^{15}N em excesso. As frações protéicas isoladas a partir desse feijão (albuminas e globulina G1), apresentaram um teor de 1,124 e 0,960 átomos % de ^{15}N em excesso, respectivamente, mostrando que esse isótopo está distribuído de uma forma relativamente homogênea entre as proteínas do feijão.

A metabolização do sulfato marcado pela planta inteira resultou numa atividade radioativa de $22,3 \cdot 10^{-4}$; $44,4 \cdot 10^{-4}$ e $21,4 \cdot 10^{-4}$ dpm/g de feijão integral, fração albumínica e globulina G1, respectivamente.

Determinou-se também o teor de enxofre total nas mesmas frações protéicas, tendo-se observado uma correlação entre a concentração total de enxofre e a atividade do enxofre-35. A relação $^{35}\text{S}/\text{S}$ manteve-se constante para as três fontes protéicas.

Os valores numéricos relativos ao conteúdo de nitrogênio e enxofre totais e ao ^{15}N e ^{35}S no feijão integral, nas frações protéicas e nas rações preparadas são apresentadas nas Tabelas 1 a 4.

7.3 - Ensaios em animais

7.3.1 - Digestibilidade e valor nutricional

Os resultados de dois ensaios biológicos, visando verificar o efeito da ingestão do feijão cozido ou de suas proteínas isoladas sobre o crescimento e aproveitamento alimentar, estão apresentados nas Tabelas 5 e 6 e na Figura 1.

Observamos uma elevada digestibilidade "real" para a albumina (92,5%) e globulina G1 (90,8%), sendo apenas a digestibilidade da fração glutelínica (78,7%) significativamente inferior à da caseína (95,2%).

Independentemente da digestibilidade, as glutelinas e albuminas promoveram o melhor crescimento dos animais embora este tenha sido baixo em comparação ao controle de caseína. O NPR ("net protein utilization" ou razão protéica líquida) calculado (mesmo para um experimento de apenas sete dias) foi muito reduzido para a globulina G1 (2,20) e para as albuminas e glutelinas foi 30% inferior ao controle de caseína (4,26).

Este ensaio procurou evidenciar os efeitos da ingestão do feijão integral sobre os índices de digestibilidade e valor nutricional, comparando-os com os efeitos causados, pela ingestão das frações protéicas isoladas. Foi incluído também, um grupo de animais que recebeu uma farinha de feijão suplementada com a fração albumínica.

TABELA 5 - Experiência 1 - Digestibilidade e "NPR" das proteínas isoladas do feijão (Ensaio de 7 dias de duração)*

Fonte Protéica	Ganho de peso (g)	Proteína ingerida (g)	NPR	Nitrogênio (g)		Digestibilidade (%)		Matéria seca fecal mg/g ração
				ingerido	fecal	"aparente"	"real"	
Caseína	17,9 [±] 3,9	5,44 [±] 0,44	4,26 [±] 0,60 ^a	0,87 [±] 0,07	0,08 [±] 0,02	90,0 [±] 2,6	95,2 [±] 1,7 ^a	34,0 [±] 5,0 ^a
Albuminas	3,8 [±] 0,7	3,03 [±] 0,03	3,00 [±] 0,19 ^{bc}	0,53 [±] 0,00	0,08 [±] 0,01	84,6 [±] 1,2	92,5 [±] 2,3 ^{ac}	46,8 [±] 2,4 ^{ad}
Globulina G1	1,3 [±] 2,3	2,96 [±] 0,46	2,20 [±] 0,48 ^{bde}	0,52 [±] 0,08	0,08 [±] 0,02	84,1 [±] 4,8	90,8 [±] 4,3 ^{ace}	54,6 [±] 14,6 ^{bdf}
Glutelinas	7,0 [±] 1,6	3,94 [±] 0,28	2,91 [±] 0,63 ^{bce}	0,69 [±] 0,05	0,18 [±] 0,03	73,2 [±] 3,4	78,7 [±] 3,5 ^{bdf}	68,4 [±] 11,1 ^{cef}

*Valores médios [±] desvio padrão de 4 ou 6 animais (caseína) por grupo.

Perda de peso de animais sob dieta aprotéica: 5,3g/rato/7 dias

Nitrogênio fecal dos animais sob dieta aprotéica: 5,28mg N/rato/dia

a, b, c, Valores nas mesmas colunas verticais, com letras diferentes, diferem estatisticamente (p ≤ 0,05).

TABELA 6 - Experiência 2 - Digestibilidade e "NPR" do feijão ou feijão suplementado com a fração albumina (Ensaio de 13 dias de duração).

Fonte Protéica	13 dias			7 últimos dias				
	Ganho de peso (g)	Proteína ingerida (g)	NPR	Nitrogênio (g)		Digestibilidade (%)		Matéria seca fecal mg/g ração
				ingerido	fecal	"aparente"	"real"	
Caseína	44,2 [±] 6,8 ^a	12,82 [±] 1,20	4,12 [±] 0,27 ^a	1,01 [±] 0,06	0,07 [±] 0,01	93,1 [±] 0,7	96,1 [±] 0,6 ^a	33,9 [±] 3,0 ^a
Feijão integral	14,4 [±] 1,6 ^{bd}	9,56 [±] 0,85	2,43 [±] 0,32 ^{bd}	0,77 [±] 0,05	0,26 [±] 0,04	66,0 [±] 5,7	69,9 [±] 5,7 ^{bd}	145,5 [±] 22,0 ^{bd}
Feijão integral + albumina	18,5 [±] 1,9 ^{cd}	10,17 [±] 0,33	2,68 [±] 0,26 ^{cd}	0,91 [±] 0,09	0,30 [±] 0,02	66,7 [±] 1,6	69,9 [±] 1,3 ^{cd}	128,8 [±] 8,7 ^{cd}

* Valores médios [±] desvio padrão de 6 animais por grupo.

Perda de peso dos animais sob dieta aprotéica: 8,7g/rato/13 dias.

Nitrogênio fecal dos animais sob dieta aprotéica: 4,28mg N/rato/dia.

a, b, c, d - Valores nas mesmas colunas verticais, com letras diferentes, diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$).

FIGURA 1 - Curvas de peso de ratos, alimentados com rações de caseína e proteínas do feijão (10% de proteína).

Ainda, na Tabela 5 são mostrados os resultados referentes às quantidades de proteína e nitrogênio ingeridos, bem como à excreção fecal de matéria seca, calculada em função da quantidade de ração consumida.

Os grupos de animais que receberam as rações à base de caseína, albuminas, globulina G1 e glutelinas excretaram respectivamente 34,0; 46,8; 54,6 e 68,4mg de matéria fecal seca/g ração ingerida. As comparações estatísticas mostram que apesar de todas as frações protéicas parecerem estimular uma maior ex-

creção fecal, apenas a da albumina foi estatisticamente semelhante à da caseína.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados de um experimento, no qual grupos de seis ratos, foram alimentados com ração cujo teor protéico (10%) foi fornecido por caseína, farinha de feijão integral ou farinha de feijão suplementada com a fração albumínica ao nível de 10% em relação a proteína (tanto a farinha integral como a farinha já suplementada foram aquecidas durante 30 minutos a 121°C, para a inativação dos fatores antinutricionais).

7.3.2 - Ensaio biológico do feijão integral, albuminas e globulina G1, marcados isotopicamente

Essa experiência foi realizada de acordo com o esquema experimental descrito no item 6.4.3.

Basicamente dividiu-se o ensaio em três fases: numa primeira fase de adaptação, os animais receberam durante 3 dias as dietas não marcadas, contendo 10% de proteína proveniente do feijão integral, albuminas, globulina G1 ou caseína.

Na 2a. fase, os animais foram alimentados durante 6 dias com rações preparadas de forma semelhante à anterior, com a única diferença das fontes protéicas estarem marcadas isotopicamente.

Numa 3a. fase "de decaimento" de 6 dias de duração os animais voltaram a receber as rações "frias".

Paralelamente à determinação diária das concentrações isotópicas das rações ingeridas e do material fecal eliminado, avaliamos a "digestibilidade" e a "utilização biológica" pela metodologia convencional (de análise química), reunindo esses resultados como comparação e confirmação daqueles já descritos.

As variações de peso, e a utilização biológica das proteínas, apresentadas pelos animais submetidos às diferentes rações, são mostradas na Tabela 7.

Durante os 12 dias da experiência, apenas os animais que receberam ração à base de albuminas, tiveram um crescimento mensurável, um "NPR" de 71% e digestibilidade de 90% em relação à caseína considerada 100%.

A globulina G1, apesar de sua boa digestibilidade, não proporcionou nenhum crescimento aos animais. No grupo de animais alimentados com ração à base de feijão integral, observou-se reduzido índice de digestibilidade (67%), ganho de peso e "NPR", acompanhado de uma elevada excreção de nitrogênio, três vezes superior à da caseína.

7.3.3 - Efeito do feijão integral, da fração albumina e da globulina G1 na perda de nitrogênio

Estudaram-se aqui, separadamente, cada uma das frações protéicas (albuminas e globulina G1) como também o feijão integral, determinando-se o balanço diário entre o nitrogênio total e ^{15}N , ingeridos e excretados nas fezes durante os doze dias da experiência.

TABELA 7 - Experiência 3 - Digestibilidade e "NPR" do feijão integral e de suas proteínas isoladas.
(Ensaio de 12 dias de duração)*.

Fonte Protéica	Ganho de peso (g)	Proteína ingerida (g)	NPR	Nitrogênio (g)		Digestibilidade (%)		Matéria se ca fecal mg/g ração
				ingerido	fecal	"aparente"	"real"	
Caseína	36,3 ± 7,8	10,05 ± 1,81	4,46 ± 0,10 ^a	1,61 ± 0,29	0,18 ± 0,04	89,0 ± 0,7	91,8 ± 1,1 ^a	41,3 ± 1,0 ^a
Feijão integral	4,8 ± 1,7	5,85 ± 0,59	2,27 ± 0,29 ^{be}	1,03 ± 0,10	0,38 ± 0,08	62,8 ± 6,5	67,2 ± 6,6 ^{bd}	127,9 ± 19,8 ^{bd}
Albuminas	13,7 ± 1,1	7,02 ± 0,59	3,18 ± 0,39 ^{cfh}	1,23 ± 0,10	0,26 ± 0,03	79,1 ± 2,1	82,8 ± 2,0 ^{ceg}	68,3 ± 6,1 ^{ceg}
Globulina G1	-2,1 ± 0,8	4,36 ± 2,09	1,51 ± 0,41 ^{dgi}	0,76 ± 0,10	0,08 ± 0,01	89,5 ± 1,6	95,4 ± 0,7 ^{afh}	37,6 ± 4,9 ^{afh}

* Valores médios ± desvio padrão de 4 animais por grupo.

Perda de peso dos animais sob dieta aprotéica: 8,5g rato/12 dias.

Nitrogênio fecal dos animais sob dieta aprotéica: 3,77mg N/dia/rato.

a,b,c, ... Valores nas mesmas colunas verticais, com letras diferentes, diferem estatisticamente.

(P ≤ 0,05).

As Tabelas 8 a 10 mostram, como era de se esperar, que a porcentagem de excreção de nitrogênio total se manteve aproximadamente constante para cada fonte protéica durante todo o experimento. Assim, para o feijão integral, a eliminação de nitrogênio total foi muito elevada, da ordem de 34,4% em média; 20,4% para as albuminas e 10,7% para a globulina G1.

Quanto à excreção fecal de ^{15}N observamos, nos primeiros três dias após a administração da ração marcada, um aumento na excreção desse isótopo, atingindo neste período um estado que tomamos como "estacionário" e no qual a relação entre a quantidade de ^{15}N ingerido e excretado se manteve praticamente inalterada, até o sexto dia, quando os animais passaram a receber novamente as rações não marcadas, com o intuito de observar a velocidade de decaimento da concentração do isótopo nas fezes.

A excreção de ^{15}N na fase de equilíbrio (49-69 dia) mostrou ser constante e específica para cada fonte de proteína, apesar de ser inferior às quantidades médias de nitrogênio total excretadas. Esses resultados serão discutidos mais adiante, sendo possível, como veremos, atribuir esse efeito a diversas causas.

7.3.4 - Efeito do feijão integral e das frações protéicas isoladas, na eliminação de enxofre

Paralelamente às determinações de nitrogênio total e ^{15}N nas rações ingeridas e no material fecal, determinou-se tam

TABELA 8 - Experiência 3 - Ensaio do feijão integral: Ingestão e excreção fecal diárias de nitrogênio total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) e de ^{15}N .*

Dia	N total (mg)/rato					¹⁵ N(mg ¹⁵ N em excesso)/rato					% de excreção em relação ao ingerido	
	ingerido		excretado			ingerido		excretado			N total	¹⁵ N
Ração marcada	1	95,02 ±	9,16	30,36 ±	7,75	0,45 ±	0,04	0,039 ±	0,016	31,95	8,67	
	2	93,31 ±	10,45	35,22 ±	4,07	0,44 ±	0,05	0,104 ±	0,010	37,74	23,64	
	3	94,60 ±	9,38	38,71 ±	11,20	0,45 ±	0,04	0,138 ±	0,035	40,91	30,67	
	4	95,02 ±	9,16	35,09 ±	11,88	0,45 ±	0,04	0,125 ±	0,041	36,93	27,78	
	5	86,93 ±	15,93	35,45 ±	11,30	0,41 ±	0,07	0,134 ±	0,040	40,78	32,68	
	6	91,19 ±	12,48	31,90 ±	8,69	0,43 ±	0,06	0,119 ±	0,035	34,98	27,67	
Ração não marcada	7	88,42 ±	9,44	28,62 ±	3,19	—		0,080 ±	0,009	32,37	—	
	8	88,63 ±	10,04	31,18 ±	9,03	—		0,044 ±	0,014	35,18	—	
	9	93,32 ±	15,95	27,92 ±	10,33	—		0,019 ±	0,006	29,92	—	
	10	98,01 ±	21,76	28,52 ±	8,97	—		0,019 ±	0,007	29,10	—	
	11	102,69 ±	29,01	31,54 ±	8,11	—		0,014 ±	0,004	29,10	—	
	12	nd		32,59 ±	10,15	—		0,013 ±	0,005	nd	—	
Média						0,44	0,126**			34,4	29,37**	

*Valores médios $\pm$ desvio padrão (n=4)

Marcação isotópica da ração: 0,493 átomos % de ^{15}N em excesso

** % de excreção média de ^{15}N na fase de "equilíbrio" (4º ao 6º dia)

nd = não determinado.

TABELA 9 - Experiência 3 - Ensaio da fração albumínica: Ingestão e excreção fecal diárias de nitrogênio total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) e de ^{15}N *.

Dia	N total (mg) / rato		^{15}N (mg ^{15}N em excesso)/rato				% de excreção em relação ao ingerido	
	ingerido	excretado	ingerido	excretado		N total	^{15}N	
Ração marcada	1	93,31 $\pm$ 6,72	19,93 $\pm$ 5,11	1,00 $\pm$ 0,07	0,037 $\pm$ 0,017	21,36	3,70	
	2	93,32 $\pm$ 9,10	24,07 $\pm$ 6,71	1,00 $\pm$ 0,10	0,166 $\pm$ 0,033	25,79	16,60	
	3	94,12 $\pm$ 9,56	21,34 $\pm$ 5,31	1,01 $\pm$ 0,10	0,158 $\pm$ 0,042	22,67	15,64	
	4	92,32 $\pm$ 8,00	19,11 $\pm$ 4,43	1,04 $\pm$ 0,08	0,154 $\pm$ 0,034	19,64	14,81	
	5	113,34 $\pm$ 13,24	20,49 $\pm$ 8,55	1,22 $\pm$ 0,14	0,169 $\pm$ 0,076	18,08	13,85	
	6	114,95 $\pm$ 12,01	22,68 $\pm$ 2,84	1,23 $\pm$ 0,13	0,193 $\pm$ 0,026	19,73	15,69	
Ração não marcada	7	110,94 $\pm$ 18,61	20,93 $\pm$ 1,01	—	0,146 $\pm$ 0,018	18,87	—	
	8	114,14 $\pm$ 15,22	23,70 $\pm$ 4,50	—	0,059 $\pm$ 0,029	20,76	—	
	9	114,94 $\pm$ 14,53	22,49 $\pm$ 4,61	—	0,026 $\pm$ 0,002	19,57	—	
	10	117,34 $\pm$ 13,17	19,49 $\pm$ 4,17	—	0,019 $\pm$ 0,003	16,61	—	
	11	117,34 $\pm$ 8,81	25,21 $\pm$ 6,99	—	0,021 $\pm$ 0,005	21,48	—	
	12	nd	18,06 $\pm$ 4,23	—	0,012 $\pm$ 0,003	nd	—	
Média			1,08	0,172**	20,41	14,78**		

* Valores médios $\pm$ desvio padrão (n=4)

Marcação isotópica da ração: 1,076 átomos % de ^{15}N em excesso.

** % de excreção média de ^{15}N na fase de "equilíbrio" (4º ao 6º dia)

nd = não determinado

TABELA 10 - Experiência 3 - Ensaio da globulina G1: Ingestão e excreção fecal diárias de nitrogênio total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) e de ^{15}N . *

	Dia	N total (mg)/rato		^{15}N (mg ^{15}N em excesso)/rato		% excreção em relação ao ingerido	
		ingerido	excretado	ingerido	excretado	N total	^{15}N
Ração marcada	1	81,25	11,75	0,405	traços	14,46	traços
	2	77,50	8,25	0,385	0,012	10,64	3,12
	3	69,75	5,25	0,345	0,010	7,53	2,90
	4	71,00	5,50	0,35	0,013	7,75	3,69
	5	118,75	6,00	0,59	0,016	5,05	2,71
	6	118,75	8,00	0,59	0,025	6,74	4,24
Ração não marcada	7	44,25	5,50	—	0,014	12,43	—
	8	42,00	6,00	—	0,010	14,28	—
	9	44,00	5,50	—	nd.	12,50	—
	10	44,75	7,25	—	0,004	16,20	—
	11	67,25	6,52	—	0,003	9,69	—
	12	nd	5,52	—	traços	nd	—
Média				0,44	0,018**	10,66	$\bar{M}$ 3,54**

* Valores médios de um "pool" de 4 animais

Marcação isotópica da ração: 0,498 átomos % de ^{15}N em excesso.

** % de excreção média de ^{15}N na fase de "equilíbrio" (4º ao 6º dia)

nd = não determinado.

bem o balanço do enxofre para o feijão integral e para a fração albumínica, sendo a globulina G1 dispensada por possuir reduzido teor de aminoácidos sulfurados.

As Tabelas 11 e 12 mostram a ingestão e excreção fecal diárias do enxofre total para essas duas fontes protéicas. Os resultados mostram que apesar da ração à base de feijão integral conter um teor de enxofre 17% superior em relação à ração contendo albuminas, a ingestão média diária de enxofre total foi semelhante nos dois grupos de animais (9,0 e 9,2mg/dia/rato) pois a diferença foi compensada por uma maior quantidade de ração consumida pelos animais mantidos com a ração à base de albuminas.

A eliminação, calculada como porcentagem do enxofre ingerido, foi estatisticamente semelhante entre o feijão integral e as albuminas, sendo de 26,8 e 23,3%, respectivamente.

A excreção de enxofre-35 determinada também para a globulina G1, apresentada nas Tabelas 11 a 13, elevou-se nos primeiros três dias semelhante ao que aconteceu com o ^{15}N atingindo após esse tempo um valor praticamente constante. Nesta fase estacionária (do 4º ao 6º dia) o valor médio de excreção do ^{35}S em relação ao ingerido, foi de 32,4, 18,7 e 6,7 respectivamente, para o feijão integral, albuminas e globulina G1.

TABELA 11 - Experiência 3 - Ensaio do feijão integral: Ingestão e excreção fecal diárias de enxofre total e de ^{35}S .*.

	Dia	S total (mg)/rato		^{35}S (dpm x 10^{-5})/rato		% excreção em relação ao ingerido	
		ingerido	excretado	ingerido	excretado	S total	^{35}S
Ração marcada	1	9,30 $\pm$ 0,54	2,32 $\pm$ 0,62	2,73 $\pm$ 0,27	0,27 $\pm$ 0,15	24,9	9,9
	2	9,14 $\pm$ 1,02	1,98 $\pm$ 0,14	2,69 $\pm$ 0,30	0,71 $\pm$ 0,05	21,7	26,4
	3	9,27 $\pm$ 0,92	3,11 $\pm$ 0,78	2,72 $\pm$ 0,27	0,95 $\pm$ 0,26	33,5	34,9
	4	9,31 $\pm$ 0,90	2,40 $\pm$ 1,00	2,73 $\pm$ 0,27	0,74 $\pm$ 0,39	25,8	27,1
	5	8,51 $\pm$ 1,56	3,35 $\pm$ 0,90	2,51 $\pm$ 0,45	1,01 $\pm$ 0,30	39,4	40,2
	6	8,93 $\pm$ 1,22	2,14 $\pm$ 0,56	2,63 $\pm$ 0,35	0,79 $\pm$ 0,24	24,0	30,0
Ração não marcada	7	8,39 $\pm$ 0,55	1,86 $\pm$ 0,26	—	0,57 $\pm$ 0,08	22,2	—
	8	8,68 $\pm$ 0,98	2,10 $\pm$ 0,62	—	0,29 $\pm$ 0,11	24,2	—
	9	9,14 $\pm$ 1,56	1,98 $\pm$ 0,60	—	0,09 $\pm$ 0,04	21,7	—
	10	8,60 $\pm$ 0,55	2,54 $\pm$ 0,70	—	0,09 $\pm$ 0,04	29,5	—
	11	10,06 $\pm$ 2,84	2,81 $\pm$ 0,60	—	0,07 $\pm$ 0,03	27,9	—
	12	nd	2,83 $\pm$ 0,53	—	0,06 $\pm$ 0,03	nd	—
Média					0,84**	26,8	32,4 **

* Valores médios $\pm$ desvio padrão (n=4)

Atividade do ^{35}S na ração: 49,1 dpm . 10^{-5} /100g

** % de excreção média de ^{35}S na fase de equilíbrio (4º ao 6º dia)

nd = não determinado.

TABELA 12 - Experiência 3 - Ensaio da fração albumínica: Ingestão e excreção fecal diárias de enxofre total e de ^{35}S .*

Dia	S total (mg)/rato		^{35}S (dpm x 10^{-5})/rato		% excreção em relação ao ingerido		
	ingerido	excretado	ingerido	excretado	S	^{35}S	
Ração marcada	1	7,98 $\pm$ 0,58	2,00 $\pm$ 0,38	4,15 $\pm$ 0,30	0,18 $\pm$ 0,14	25,06	4,36
	2	7,98 $\pm$ 0,78	2,31 $\pm$ 0,62	4,16 $\pm$ 0,40	0,75 $\pm$ 0,07	28,95	18,00
	3	8,05 $\pm$ 0,82	1,50 $\pm$ 0,26	4,19 $\pm$ 0,42	0,87 $\pm$ 0,19	18,63	20,74
	4	8,32 $\pm$ 0,68	1,56 $\pm$ 0,39	4,34 $\pm$ 0,35	0,80 $\pm$ 0,13	18,75	18,34
	5	9,69 $\pm$ 1,13	1,69 $\pm$ 0,63	5,05 $\pm$ 0,59	0,89 $\pm$ 0,33	17,44	17,58
	6	9,83 $\pm$ 1,02	1,99 $\pm$ 0,20	5,13 $\pm$ 0,53	1,03 $\pm$ 0,11	20,24	20,17
Ração não marcada	7	9,48 $\pm$ 1,59	2,24 $\pm$ 0,09	—	0,75 $\pm$ 0,08	23,63	—
	8	9,76 $\pm$ 1,30	2,76 $\pm$ 0,53	—	0,39 $\pm$ 0,17	28,28	—
	9	9,83 $\pm$ 1,24	2,00 $\pm$ 0,37	—	0,21 $\pm$ 0,05	20,34	—
	10	10,03 $\pm$ 1,12	2,24 $\pm$ 0,46	—	0,13 $\pm$ 0,02	22,33	—
	11	10,03 $\pm$ 0,76	3,24 $\pm$ 0,69	—	nd	32,30	—
	12	nd	1,68 $\pm$ 0,37	—	0,08 $\pm$ 0,03	nd	—
Média				0,91**	23,30	18,70**	

* Valores médios $\pm$ desvio padrão (n=4)

Atividade do ^{35}S na ração: 71,4 dpm . 10^{-5} /100g

** % de excreção média de ^{35}S na fase de equilíbrio (4º ao 6º dia)

nd = não determinado.

TABELA 13 - Experiência 3 - Ensaio da globulina G1: Ingestão e excreção fecal diárias de ^{35}S .*

	Dia	^{35}S (dpm . 10^{-5})/rato		% excreção em relação ao ingerido
		ingerido	excretado	
Ração marcada	1	0,611	0,004	0,65
	2	0,582	0,038	6,53
	3	0,527	0,024	4,55
	4	0,533	0,035	6,57
	5	0,889	0,051	5,74
	6	0,889	0,069	7,76
Ração não marcada	7	—	0,031	—
	8	—	0,033	—
	9	—	0,022	—
	10	—	0,027	—
	11	—	0,013	—
	12	—	0,009	—
Média			0,052**	6,69**

* Valores médios de um "pool" de 4 animais.

Atividade do ^{35}S na ração: 11,73 dpm . 10^{-5} /100g

** % de excreção média na fase de "equilíbrio" (4º ao 6º dia)

8 - DISCUSSÃO

8.1 - Propriedades nutricionais do feijão e digestibilidade de suas frações protéicas

As experiências "in vitro", realizadas anteriormente, nos haviam mostrado que a globulina G1 e a fração glutelínica a apresentavam uma melhora significativa na sua susceptibilidade ao ataque enzimático, após o aquecimento; a fração albumínica, porém, contrariamente, sofria uma redução na velocidade de hidrólise enzimática (Lanfer Marquez & Lajolo, 1981; Deshpande & Nielsen, 1987c).

Podemos, agora, através de novos ensaios, comparar aqueles resultados obtidos "in vitro" com a digestibilidade "in vivo" em ensaios com ratos, e tentar explicar algumas de suas propriedades nutricionais.

Assim, com as principais frações protéicas (albuminas, globulina G1 e glutelinas) do feijão Carioca, marcadas ou não isotopicamente, procuramos evidenciar primeiramente em ensaios com animais, os efeitos tanto da ingestão do feijão integral, como de suas proteínas isoladas, sobre os índices de digestibilidade e valor nutricional. A interpretação conjunta dos re-

sultados de três experiências, permitiu delinear um comportamento específico para cada fonte protéica, que passaremos a discutir.

As Tabelas 5 e 6 e a Figura 1 mostram os resultados referentes a dois ensaios biológicos.

As albuminas e glutelinas parecem ser as frações protéicas mais interessantes sob o ponto de vista nutricional, pois promoveram "Ganhos de Peso" e valores de "NPR" maiores, superiores mesmo aos obtidos com o feijão integral. Apesar disso, os índices de "NPR" ainda são reduzidos, atingindo apenas 70% dos valores obtidos com a caseína.

Esses resultados não podem ser explicados somente com base nas diferenças de digestibilidade dessas fontes protéicas: a ração contendo a fração glutelínica mostrou uma digestibilidade significativamente inferior à da caseína, enquanto que a fração albumínica apresentou uma digestibilidade semelhante.

Dedicamos importância especial à discussão da globulina Gl, por ser a proteína predominante do feijão e por ter mostrado uma digestibilidade elevada, semelhante à da caseína, mas um valor biológico muito reduzido, não permitindo o crescimento dos animais.

A presença de fatores antinutricionais, tais como inibidores de tripsina, antiamilases e hemaglutininas, não foi a causa do reduzido aproveitamento biológico, uma vez que não foram detectados em nenhuma das frações protéicas. O aquecimento utilizado para as proteínas (30 min. em autoclave a 121°C) foi suficiente para eliminar totalmente a atividade antitriptica e

hemaglutinante, apesar de poder ter causado uma perda do valor biológico, por reduzir a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, como discutiremos adiante.

A resistência da globulina G1, crua, ao ataque enzimático, por enzimas digestivas de mamíferos, tem sido demonstrada por diversos autores (Chang & Satterlee, 1981; Lanfer Marquez & Lajolo, 1981; Liener & Thompson, 1980; Romero e Ryan, 1978), representando importante fator na reduzida digestibilidade do feijão cru. Esse comportamento pode ser atribuído à sua estrutura tridimensional compacta, estabilizada ainda pela presença de carboidratos, causando um impedimento estérico, à aproximação da enzima (Chang & Satterlee, 1981; Semino et al., 1985).

No entanto, o mesmo não se verifica após um tratamento térmico adequado, quando então a fração G1 se torna altamente susceptível à hidrólise enzimática "in vitro", fato descrito por diversos pesquisadores e confirmado recentemente por Deshpande e Nielsen, 1987b).

Outras hipóteses, que pudessem explicar a reduzida digestibilidade de leguminosas, tais como: interação das proteínas com amido, minerais, ácido fítico e polifenóis também já foram aventadas (Boonvisut & Whitaker, 1976; Deshpande et al., 1982; Aw & Swanson, 1985), sendo pouco provável, no entanto ocorrerem na globulina purificada e aquecida isoladamente.

O reduzido aproveitamento biológico da globulina G1 observado, talvez possa ser explicado pelo baixo teor de aminoácidos sulfurados nessa fração. Os teores encontrados por diversos autores tem sido discrepantes, variando entre 0,3 e 1,2g

metionina, e 0,0 e 1,1g de cisteína por 16g de nitrogênio (Antunes & Sgarbieri, 1980; Barker et al., 1976; Bradbear & Boulter, 1984; Chang & Satterlee, 1981; Ericson & Chrispeels, 1973; Lanfer Marquez & Lajolo, 1981; Liener & Thompson, 1980; Pusztai & Watt, 1970).

Essas diferenças nos teores em aminoácidos sulfurados podem ser atribuídas às variações nas técnicas de extração e purificação associadas ao reduzido teor desses aminoácidos nessa fração, dificultando o seu doseamento. Não pode ainda ser excluída a variação real no teor desses aminoácidos, devida à variedade estudada.

De qualquer forma, mesmo na melhor das hipóteses, o cálculo químico dos aminoácidos sulfurados da globulina G1, em relação à proteína do ovo, não passa de 40%.

Esta situação pode ser agravada por uma reduzida biodisponibilidade desses aminoácidos limitantes nos feijões, em torno de 50% para a metionina e de 40 a 75% para a cisteína (Evans et al., 1974; Evans & Bauer, 1978; Liener, 1976). Sgarbieri et al. (1979), relatam valores ainda menores, variando entre 29,3 a 40,6% para a metionina, em função da variedade de feijão estudada.

Preocupamo-nos em seguida com a fração G1 e o seu destino no organismo animal. A literatura científica concernente (apesar de existirem poucos trabalhos publicados), indica uma boa digestibilidade aparente e um valor biológico reduzido (Liener & Thompson, 1980). O conjunto de informações obtidas sobre a fração G1 e a experiência por nós realizada, parecem confir-

mar que a reduzida utilização biológica da globulina G1 isolada, não é causada por um impedimento na sua hidrólise enzimática "in vivo".

Além da deficiência em aminoácidos sulfurados, uma redução da biodisponibilidade de outros aminoácidos essenciais pode ser prevista. O elevado teor de carboidratos na fração globulina G1 (12%) e a elevada reatividade de carbonilas, permitem reações de condensação carbonil-amina e formação de produtos de Amadori (Reação de Maillard), reduzindo também a disponibilidade da lisina, originalmente presente na globulina G1 em quantidades suficientes. O efeito do aquecimento em autoclave a 121°C/30 min. foi demonstrado por Antunes e Sgarbieri (1980). Nessas condições uma farinha de feijão Rosinha G2 (Phaseolus vulgaris) mostrou uma queda na biodisponibilidade da lisina, de 42%. Esse tratamento levou a uma destruição completa dos inibidores de tripsina e das fitohemaglutininas, apesar do melhor valor biológico em ratos, ter sido obtido após aquecimento por apenas 10 min. a 97°C, quando uma quantidade considerável da atividade antitriptica e hemaglutinante ainda estava presente.

Para o feijão integral os índices de valor nutricional observados foram reduzidos, bem como a sua digestibilidade (ao redor de 70%) indicando haver problemas de aproveitamento. Cabe ressaltar também a elevada excreção fecal determinada em matéria seca ou em nitrogênio, 3 a 4 vezes superior àquela causada pela ingestão da ração controle de caseína, e mesmo muito superior àquela dos animais alimentados com as proteínas isoladas.

Os resultados quanto à eliminação fecal foram apresentados para mostrar que as frações protéicas isoladas são capazes de causar apenas um discreto aumento na excreção, ocorrendo o inverso porém, após a ingestão de feijão integral. Paralelamente ao ensaio do feijão integral foi incluído também, um grupo de animais alimentados com uma ração a base de feijão integral adicionado da fração albumínica. O melhor desempenho da albumina, sob o ponto de vista nutricional, nos induziu a pensar que a adição dessa proteína pudesse melhorar o aproveitamento biológico do feijão integral. Essa hipótese se justifica pelo menos em parte, uma vez que a albumina possui aproximadamente 25% dos aminoácidos sulfurados totais presentes no feijão.

Os resultados observados nesses animais, no entanto, não mostraram diferença significativa ($P \leq 0,05$) na digestibilidade, "NPR" (utilização protéica líquida) e Ganho de Peso.

Esses dados podem ser interpretados como indicativos da existência de algum componente presente no feijão integral, ou de algum mecanismo a nível intestinal, levando à formação de complexos protéicos indigeríveis, com possível comprometimento da biodisponibilidade da metionina, ou então, estimulando a secreção de nitrogênio endógeno.

Os resultados de Kakade & Evans (1966), apoiam de certa forma a hipótese da excreção endógena: a análise do conteúdo intestinal de ratos que haviam recebido uma dieta contendo feijões cozidos, mostrou que o nitrogênio total excretado nas fezes, representava cerca de 40% do total ingerido com a ração.

Resultados semelhantes foram descritos por Bressani et al. (1977); Bender & Mohammadiha (1981) e Fairweather-Tait et al., (1983), e, mesmo em humanos, foram feitos relatos sobre a elevada excreção fecal de nitrogênio após a ingestão de dietas a base de feijão (Navarrete & Bressani, 1981 e Rosales Arzú, 1977).

O terceiro ensaio biológico teve como finalidade estudar, a nível de excreção, o destino do nitrogênio e enxofre provenientes do feijão e das suas frações protéicas, diferenciando-os daqueles de origem endógena, pelo emprego de isótopos. Este mesmo ensaio foi também utilizado para reavaliar a digestibilidade e utilização biológica pela metodologia convencional.

A análise dos resultados (Tabela 7), permitiu afirmar que não houve diferenças significativas em relação aos dois ensaios anteriores: isto é, o feijão integral apresentou a menor digestibilidade "real" (67%) seguido da fração albumina (83%) e da globulina G1 (95%); o "NPR" da albumina foi significativamente maior do que das demais fontes protéicas do feijão, o que vem comprovar mais uma vez a superioridade nutricional desta fração em relação ao feijão integral. O valor biológico das albuminas, foi de 71% em relação ao controle de caseína e pode estar limitado ainda, por reações entre carboidratos e proteínas, ou mesmo entre taninos e proteínas com formação de estruturas não digeríveis pelas enzimas digestivas.

É oportuno comentar que a concentração de glicídes, determinada na fração albumínica, foi muito elevada (30mg/100mg proteína), favorecendo reações do tipo Maillard, durante o tra-

tamento térmico (30 min. em autoclave a 121°C). Semino et al. , (1985), relatam a redução da proteólise da globulina de Lupinus albus (tremoço) pela tripsina, na presença de carboidratos ligados, e um aumento na liberação de pequenos peptídeos solúveis em TCA, proporcional à quantidade de carboidratos removidos por via enzimática. O trabalho de Evans & Bauer (1978) comenta também a existência de um fator de baixo peso molecular, dialisável, presente em extratos aquosos, capaz de inibir o crescimento de ratos, mesmo após tratamento térmico.

O valor biológico da globulina G1, novamente, foi muito reduzido, podendo este quadro ter sido agravado, pelo baixo consumo de ração, associado a uma ingestão calórica inferior ao valor recomendado para ratos, em crescimento, levando os animais a uma desnutrição protéico calórica progressiva (Rogers , 1979; NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of the laboratory rat, 1972). Já a ingestão de ração está intimamente relacionada com a palatabilidade e o seu valor biológico.

Enquanto os animais alimentados com caseína mantiveram uma ingestão calórica adequada ao crescimento, o mesmo não acontecia com os animais que ingeriram as rações experimentais. Os cálculos mostraram que os animais alimentados com o feijão e com as albuminas, receberam respectivamente, 84 e 88% de suas necessidades calóricas, enquanto que os animais sustentados por uma ração à base de globulina G1 receberam apenas 70% da quantidade de energia ideal para manter um crescimento satisfatório . Considerou-se para esses cálculos, um aporte calórico de 416 Kcal/ /100g ração e a seguinte relação para animais a partir do desmame até o peso de 155g:

(Peso animal)^{0,882} = ingestão calórica diária adequada

Nessa experiência observamos novamente a elevada excreção fecal causada pela ingestão do feijão integral, quatro vezes superior a da caseína e decrescente na seguinte ordem: glutelinas > albuminas > caseína $\approx$ globulina Gl.

Fato esperado foi a observação de uma relação direta entre o teor de fibra nas rações e a excreção fecal de matéria seca. A presença de outros componentes no feijão levou a um aumento de matéria fecal e em decorrência provocou, nos animais alimentados com a ração de feijão, um aumento paralelo de nitrogênio excretado (Quadro I e Figura 2). Este fato sugere ocorrer uma complexação da proteína com esses componentes, tornando-a inaproveitável ao organismo animal, ou mesmo, um incremento na secreção de proteínas de origem endógena.

QUADRO I - Relação entre a excreção fecal e o teor de fibra da dieta*

Fonte Protéica	Matéria fecal seca mg/g ração	Matéria seca fecal/ /Nitrogênio fecal	% Fibra da dieta
Feijão integral	134,1	22,5	14,5
Glutelinas	68,4	17,5	7,4
Albuminas	57,5	18,9	6,2
Globulina Gl	46,1	22,2	3,1
Caseína	36,4	25,9	1,0

* Média dos valores das três experiências.

FIGURA 2 - Efeito da ingestão das rações contendo feijão integral ou suas proteínas isoladas, sobre a excreção fecal de matéria seca e de nitrogênio. Experiência 1:E1; Experiência 2-E2; Experiência 3:E3.

8.2 - Efeito do feijão integral, das albuminas e da globulina G1, na perda de nitrogênio total e nitrogênio-15

Com a metodologia empregada nos experimentos realizados, baseada no simples balanço entre o nitrogênio ingerido e excretado, não foi possível identificar a origem do nitrogênio fecal dos animais que ingeriram rações à base de feijão e de suas frações protéicas isoladas.

A exploração dos resultados da terceira experiência com o emprego de proteínas marcadas, foi útil, porém, para explicar os resultados: se relacionados com a reduzida digestibilidade do feijão e (ou) com as elevadas perdas fecais de nitrogênio endógeno.

As Tabelas 8 a 10 mostram as análises diárias relativas à ingestão e excreção de nitrogênio total e ^{15}N .

Os valores de excreção fecal de ^{15}N , doze horas após o início da ingestão da ração marcada, forneceram dados sobre a participação do ^{15}N proveniente da dieta.

A escolha das doze horas para efetuar a primeira análise isotópica, baseou-se nos trabalhos de Souffrant et al., (1981); Zimmer et al., (1975) e Zebrowska et al., (1976) que consideram a reciclagem do ^{15}N , durante as 16 horas iniciais, muito reduzida, considerando ser o nitrogênio marcado e excretado neste período, quase exclusivamente proveniente da dieta.

A excreção fecal de ^{15}N nessas primeiras 12 horas foi reduzida, mas variável para as três rações experimentais, e os

valores encontrados podem ser interpretados comparativamente . Os animais que receberam o feijão integral, excretaram nestas 12 horas, 9% do ^{15}N ingerido; os animais que ingeriram a ração contendo as albuminas eliminaram 4% e aqueles alimentados com a globulina G1 excretaram menos do que 1% do ^{15}N , ingerido nesse mesmo período.

Apesar dos desvios da média de quatro animais em cada grupo experimental, estes resultados podem representar uma diferença na excreção do ^{15}N originário da dieta: a ingestão de feijões cozidos causou uma elevada excreção de nitrogênio proveniente do próprio feijão (aproximadamente 10 vezes superior aquela provocada pela ingestão de globulina G1) acompanhada também de uma alta excreção de nitrogênio endógeno, sendo a soma de ambas, responsável pela excreção dos 34% do nitrogênio ingerido.

Conclusões semelhantes se obtêm, calculando-se a diluição isotópica que o ^{15}N da ração sofreu ao passar pelo trato gastro-intestinal. No Quadro II estão apresentadas as concentrações isotópicas das três rações e das fezes colhidas 12 horas após o início da ingestão das rações marcadas, expressas em átomos % de ^{15}N em excesso.

Observamos nesse quadro que o ^{15}N fecal, proveniente do feijão integral, foi diluído 3,9 vezes com o nitrogênio não marcado; o nitrogênio proveniente das albuminas em 5,8 vezes e o da globulina G1 em 17,8 vezes. Estes valores indicam que o ^{15}N excretado em concentração muito reduzida nas fezes dos animais que haviam recebido a ração à base de globulina G1 vem confirmar não haver problemas de digestão e (ou) absorção dessa fra

QUADRO II - Diluição isotópica do ^{15}N das rações, pela passagem no trato gastro-intestinal dos animais.

Fonte protéica	^{15}N na ração*	^{15}N nas fezes**	Fator de diluição do ^{15}N	Excreção fecal de N total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) (% da ingestão)
Feijão inte- gral	0,493	0,125	3,9	34
Albuminas	1,076	0,185	5,8	20
Globulina Gl	0,498	0,028	17,8	11

* Átomos % de ^{15}N em excesso.

** Fezes coletadas 12 horas após o início da ingestão da ração marcada; teor expresso em átomos % de ^{15}N em excesso.

ção protéica do feijão. Nesse caso, a elevada diluição isotópica do nitrogênio marcado na ração, evidencia que o nitrogênio endógeno representa uma elevada porcentagem da quantidade total de nitrogênio excretada. No entanto, a reduzida quantidade de nitrogênio eliminada, pelos animais que ingeriram a globulina Gl, sugere que a proteína predominante do feijão, pouco contribui na elevada excreção de nitrogênio decorrente da ingestão do feijão integral.

A ração à base de albuminas do feijão evocou, nos animais que a ingeriram, uma resposta intermediária, com significativa participação tanto do nitrogênio exógeno como do endógeno.

Resultados de Partridge et al., 1985 em estudos com

ratos, indicam que, mesmo até 8 horas após a ingestão de uma ração à base de cevada, a excreção fecal de dicromato, utilizado como indicador não absorvível, não ultrapassou 10% do ingerido. Apesar dessa crítica relativa à possibilidade do esvaziamento incompleto do intestino grosso, 12 horas após a ingestão, a análise fecal em tempos mais longos forneceria um valor para o ^{15}N da dieta, falseado (aumentado) pela secreção de nitrogênio endógeno, já marcado isotopicamente.

Nas Tabelas 8 a 10 observamos ainda um aumento na excreção diária de ^{15}N , atingindo um "estado quase-estacionário" dentro de três dias, no qual a relação entre o ^{15}N ingerido e o excretado se manteve aproximadamente constante, para cada dieta experimental. Assim, o valor dessa relação foi de 29,4% para o feijão integral, 14,8% para as albuminas e de apenas 3,5% para a globulina G1. Nessa fase "quase estacionária" os valores de excreção de ^{15}N já contêm, além de ^{15}N proveniente da dieta, um componente de origem endógena marcado isotopicamente. As digestibilidades calculadas a partir desses dados, através do balanço entre o ^{15}N ingerido e excretado, representariam "digestibilidades aparentes", e já não distinguem a origem do ^{15}N fecal. Na Figura 3, encontramos as diferenças na excreção de ^{15}N , 12 horas após o início da ingestão das rações marcadas e na fase de equilíbrio.

Comparando-se o nível de excreção de ^{15}N (em relação ao ingerido) com o do N total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$), observamos para o N total, uma excreção constante durante o período de ensaio, embora a quantidade de N total excretada tenha sido diferente para cada fonte protéica. Assim, os animais que receberam feijão

FIGURA 3 - Excreção fecal de ^{15}N (percentagem da ingestão média diária) 12 horas após o início da ingestão da ração marcada e na fase de equilíbrio (4º ao 6º dia da experiência).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

integral, apresentaram uma excreção de N total muito elevada, da ordem de 34,4%. Na fração albumínica a excreção foi de 20,4% e para a globulina G1 de 10,7%.

Já o nível de excreção do ^{15}N na fase de equilíbrio (4º ao 6º dia) foi inferior ao do N total. No feijão integral e nas albuminas, a diferença foi de 15 e 18% respectivamente, e para a globulina G1 da ordem de 67%. Embora a diferença encontrada na globulina G1 entre o ^{15}N e o N total excretados, seja muito grande, possivelmente, foi causada pela reduzida excreção de ^{15}N , dificultando a análise e elevando o erro analítico; a digestibilidade aparente para o N total e o ^{15}N calculada dessa forma variou no entanto de apenas 91% para 96%.

Em trabalho recente, realizado no Brasil, Costa de Oliveira & Sgarbieri (1986b), estudando a interferência do N en d $\acute{o}$ geno na digestibilidade e no valor biológico do feijão ou de seu extrato protéico, cru ou autoclavado, relataram que a digestibilidade e o valor biológico calculados a partir do balanço de ^{15}N ingerido e excretado em ensaio com ratos, durante 4 dias, foram superiores em relação aos valores baseados no nitrogênio total. Estes autores acreditam não haver secreção de nitrogênio end $\acute{o}$ geno marcado, durante os quatro dias do experimento, de modo que a digestibilidade calculada com base no ^{15}N , representaria a digestibilidade real do feijão.

No entanto, a diferença na excreção de N total e ^{15}N pode ser explicada de outras formas: é possível ocorrer uma retenção de parte do ^{15}N absorvido, pela própria parede intestinal, sem ingressar no "pool nitrogenado". Rerat et al. (1980),

demonstraram em porcos, que 10-15% dos aminoácidos livres são retidos pela mucosa intestinal, principalmente do intestino delgado.

Anteriormente, Krawielitzki (1972) também já havia observado em ratos, que receberam uma dieta contendo metionina marcada, que 14% da metionina ingerida, ficavam retidos na parede gastro-intestinal. Acredita o autor, que esta metionina absorvida seja rapidamente incorporada nas secreções digestivas, re-excretada e submetida novamente aos processos de degradação e absorção.

Outra hipótese e que complementa a anterior, seria a de uma incorporação de ^{15}N em proteínas musculares ou em proteínas dos pelos dos animais em crescimento, que sabidamente possuem uma reduzida atividade metabólica, retirando este ^{15}N de circulação. Desta forma o ^{15}N não teria atingido ainda um estado de equilíbrio no organismo animal.

A análise da excreção fecal de ^{15}N , durante a fase do experimento na qual os animais já voltaram a receber ração não marcada (7º ao 12º dia), forneceu informações sobre a velocidade de excreção do nitrogênio marcado.

Assim, apresentamos na Figura 4 as curvas de excreção do ^{15}N em relação ao valor médio de ^{15}N ingerido diariamente. A concentração isotópica fecal correspondente ao feijão integral e às albuminas, mostrou a partir do 6º dia uma fase inicial de queda rápida da concentração de ^{15}N .

FIGURA 4 - Curvas de excreção fecal de ^{15}N (% da ingestão média diária) dos animais ($n=4$), alimentados com feijão integral, albuminas e globulina G1.

Na Figura 5 representamos os valores de ^{15}N fecais, obtidos a partir do 6º dia, em escala semilogarítmica contra o tempo no qual ocorreu a excreção. Obtivemos curvas que mostram entre o 6º e o 9º dia as velocidades correspondentes à eliminação de ^{15}N endógeno + exógeno. Nesse período, as curvas correspondentes ao feijão integral e à fração albumínica, foram praticamente paralelas, ocorrendo redução de 50% da concentração do ^{15}N fecal em aproximadamente 24 horas. A partir do 9º dia a eliminação do ^{15}N foi aparentemente mais lenta, correspondendo principalmente do ^{15}N de origem endógena.

A globulina G1, por sua vez, mostrou entre o 6º e o 12º dia, uma velocidade menor de eliminação de ^{15}N fecal, com uma "meia-vida" de aproximadamente 48 horas. Nesse caso a ele-

FIGURA 5 - Redução da concentração de ^{15}N nas fezes, durante a fase de decaimento (6º-12º dia), dos animais alimentados com feijão integral, albuminas e globulina G1.

vada digestibilidade da globulina G1, determina uma participação predominante de ^{15}N endógeno durante a fase de decaimento (do 6º ao 12º dia).

8.3 - Efeito do feijão integral, das albuminas e da globulina G1 na eliminação de enxofre.

Concomitante à análise do nitrogênio total e do ^{15}N , acompanhamos a excreção fecal do enxofre total e do seu isótopo radioativo ^{35}S , com a finalidade de detectar algum desvio na metabolização dos aminoácidos sulfurados em relação ao nitrogênio total, que ajudasse explicar a reduzida biodisponibilidade desse

aminoácido.

Os efeitos da ingestão das três fontes protéicas sobre a eliminação fecal diária do enxofre total estão apresentados nas Tabelas 11 e 12. Verificamos que, tanto os animais que receberam o feijão integral, como aqueles alimentados com a fração albumínica, excretaram respectivamente, 26,8 e 23,3% do enxofre total ingerido. Este balanço não foi realizado com a globulina G1, por possuir teor de enxofre total muito reduzido.

Nas Tabelas 11 a 13 apresentamos os dados relativos à ingestão e excreção fecal de ^{35}S . Incluímos nesse balanço a globulina G1, pois a sensibilidade da análise isotópica permitiu a sua determinação quantitativa.

A excreção do ^{35}S durante as primeiras 12 horas após o início da ingestão da ração marcada, foi semelhante à observada para o ^{15}N . Os grupos de feijão integral, albuminas e globulina G1 excretaram respectivamente, 9,9%, 4,3% e 0,6% do ^{35}S ingerido, e que consideramos ser de origem exógena.

Raciocínio semelhante ao adotado para o ^{15}N , permitiu calcular a diluição que o ^{35}S da ração sofreu ao passar pelo trato gastro-intestinal. Apresentamos no Quadro III a relação entre o enxofre total e o ^{35}S nas rações e nas fezes coletadas 12 horas após o início da ingestão das rações marcadas.

Observamos, um aumento da relação S total/ ^{35}S nas fezes dos animais que ingeriram o feijão integral ou as albuminas, o que significa uma diluição do ^{35}S proveniente da ração por enxofre não marcado de origem endógena. Assim, quanto maior for a diluição, maior será também a participação da secreção endógena.

QUADRO III - Diluição isotópica do ^{35}S das rações, pela passagem no trato gastrointestinal dos animais.

	S/ ^{35}S na ração ingerida *	S/ ^{35}S nas fezes**	Fator de diluição do ^{35}S
Feijão integral	3,4	8,5	2,5
Albuminas	1,92	11,05	5,75
Globulina G1	n.d.	n.d.	—

n.d. = não determinado

* mg S/dpm. 10^{-5} ingeridos durante as primeiras 12 horas

** fezes coletadas 12 horas após o início da ingestão da ração marcada.

As curvas de eliminação do ^{35}S para as três rações é tão representadas na Figura 6, com a finalidade de compará-las às curvas de excreção do ^{15}N . O comportamento do ^{35}S foi semelhante ao do ^{15}N , apesar de ser excretado em níveis levemente superiores, o que poderá causar, a longo prazo, uma depleção de sulfurados.

FIGURA 6 - Curvas de excreção fecal de ^{35}S (% da ingestão média diária) dos animais (n=4) alimentados com feijão integral, albuminas e globulina G1.

Na Figura 7 observamos que ambas as rações (feijão integral e albuminas) provocaram nos 3 dias subsequentes à suspensão da ração marcada (6º ao 9º dia), um rápido declínio da atividade isotópica, semelhante ao obtido para o ^{15}N (redução da atividade para 50% em $\pm$ 24 horas). A eliminação de ^{35}S , aparentemente mais lenta a partir do 9º dia, sugere novamente ter se esgotado o ^{35}S proveniente do próprio feijão ou da fração albumínica, sendo o ^{35}S eliminado, proveniente de fontes endógenas.

FIGURA 7 - Redução da atividade isotópica do ^{35}S nas fezes, durante a fase de decaimento (6º-12º dia), dos animais alimentados com feijão integral, albuminas e globulina G1.

A reduzida excreção isotópica fecal manifestada pela ingestão da globulina G1, torna impreciso o cálculo da "meia-vida biológica" do ^{35}S , embora pareça ser semelhante à do ^{15}N , (48 horas) com participação predominante de ^{35}S de origem endógena.

Após termos discutido isoladamente o efeito da ingestão do feijão e de suas proteínas sobre a excreção de nitrogênio e enxofre, apresentamos agora a Figura 8, que reúne os resultados da eliminação desses elementos, diferenciados de acordo com a sua origem, em endógena e exógena.

Visualizamos a elevada excreção de nitrogênio e de enxofre, pelos animais que ingeriram a ração contendo o feijão integral, superior a 30% do ingerido. As fezes coletadas 12 horas após o início da ingestão dessa fonte protéica, apresentaram um teor de ^{15}N e uma atividade do ^{35}S correspondente a aproximadamente 1/3 do ingerido, que consideramos ser proveniente quase que exclusivamente do próprio feijão. Evidenciamos, assim, paralelamente à excreção de nitrogênio e enxofre exógeno, uma elevada perda de material endógeno.

A ingestão da fração albumínica provocou uma excreção de nitrogênio e enxofre menor, da ordem de aproximadamente 20% do ingerido, havendo participação significativa tanto de fontes exógenas como endógenas.

Observamos finalmente que a ingestão da ração contendo a globulina G1, provocou uma perda fecal muito reduzida, inferior até à eliminação dos animais sob a ração de caseína. Es

FIGURA 8 - Efeito da ingestão de rações contendo feijão integral, albuminas ou globulina G1, marcados isotopicamente, sobre a excreção de nitrogênio e enxofre.

- nitrogênio total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) ou enxofre químico.
- nitrogênio (^{15}N) ou enxofre (^{35}S) nas primeiras 12 horas (exógeno).
- nitrogênio (^{15}N) ou enxofre (^{35}S) na fase de "equilíbrio" (endógeno + exógeno).

ta reduzida excreção fecal, embora possa estar subestimada devido a relativa "desnutrição" dos animais que ingeriram essa fonte protéica, mostram mais uma vez não haver problemas de digestibilidade e (ou) absorção; o nitrogênio e enxofre excretados provinham principalmente de fontes endógenas.

9 - CONCLUSÕES

9.1 - O feijão integral bem como as suas frações protéicas isoladas mostraram um aproveitamento biológico reduzido.

A globulina G1 tem elevada digestibilidade, mas reduzidos índices de "NPR" e "Ganhos de Peso". O reduzido aproveitamento da globulina G1 isolada não é causado por um impedimento na sua hidrólise enzimática "in vivo".

As frações, albumínica e glutelínica são as mais interessantes sob ponto de vista nutricional, tendo apresentado os melhores aproveitamentos biológicos, apesar de sua digestibilidade relativamente baixa.

* 9.2 - A ingestão de feijão integral provocou elevada excreção de matéria e nitrogênio fecais, 3-4 vezes superior àquela provocada pela ingestão da ração controle de caseína, enquanto as frações protéicas isoladas, causaram apenas um discreto aumento na excreção. Existe uma relação direta entre o teor de fibra proveniente do feijão e a excreção fecal de N, o que su-

gere, uma complexação da proteína, com esses componentes, tornando-a inaproveitável ao organismo animal, ou um incremento do N excretado por via endógena,.

9.3 - Em ensaios empregando isótopos do nitrogênio, demonstramos que a ingestão de feijões cozidos causou uma excreção de nitrogênio proveniente do próprio feijão, 10 vezes superior àquela provocada pela ingestão da globulina, acompanhada de uma alta excreção de nitrogênio endógeno, sendo a soma equivalente a 34% do nitrogênio ingerido.

9.4 - O nitrogênio fecal decorrente da ingestão da globulina G1, parece ser quase exclusivamente de origem endógena, apesar desta excreção ter pouco significado devido à reduzida excreção de material nitrogenado (máximo 10%).

9.5 - A ingestão da ração à base de albuminas, provocou nos animais uma excreção fecal com participação significativa tanto do nitrogênio exógeno como endógeno, sendo a excreção total de nitrogênio de 20%.

9.6 - A excreção de ^{35}S pelos animais alimentados com rações à base de feijão integral ou suas frações proteicas isoladas, mostrou um perfil semelhante à excreção de ^{15}N , embora em níveis levemente superiores.

10 - RESUMO

O estudo da digestibilidade e do aproveitamento biológico do feijão (Phaseolus vulgaris, L.), variedade Carioca e de suas principais frações protéicas foi realizado em ensaios biológicos com ratos, após tratamento térmico adequado (cocção).

A metodologia convencional, baseada no "Ganho de Peso" e na razão entre o N ingerido e excretado, seguiu-se uma técnica utilizando feijões e suas frações protéicas previamente marcadas com ^{15}N e ^{35}S .

A ingestão das rações causou respostas diferentes nos animais, específicos para cada fonte protéica.

Os animais alimentados com o feijão integral tiveram reduzido aproveitamento biológico e excretaram 34% do nitrogênio ingerido, sendo este valor 3-4 vezes superior ao causado pela ingestão da ração controle de caseína. As frações, albumínicas e glutelínicas, apresentaram valores de "NPR" e "Ganhos de Peso" superiores, apesar de sua relativa baixa digestibilidade (70-80%). A globulina Gl, ^{cozida} altamente digerível (92%) teve uma utilização biológica muito reduzida, não permitindo o crescimento dos animais.

O ensaio biológico do feijão e de suas proteínas, marcados isotopicamente, permitiu diferenciar a origem do nitrogênio e do enxofre fecal, se endógena ou exógena. A concentração de ^{15}N em excesso, determinado nas fezes 12 horas após o início

ção da ingestão das rações marcadas, consideramos ser de origem exógena, sendo esses valores interpretados comparativamente. A ingestão de feijões cozidos causou nos animais uma excreção de nitrogênio proveniente do próprio feijão, 10 vezes superior à provocada pela ingestão da globulina G1, que aliada à elevada perda de nitrogênio endógeno, totalizou o equivalente a 34% do nitrogênio ingerido. Ratos alimentados com a globulina G1 excretaram nas primeiras 12 horas apenas quantidades muito reduzidas de ^{15}N , e mesmo na fase de equilíbrio (49-69 dia de ingestão da ração marcada) quando o ^{15}N excretado corresponde ao exógeno + endógeno já marcado, a perda de N total não ultrapassou 10% do ingerido.

A ingestão da fração albumínica, por sua vez, causou uma eliminação de 20% do N total ingerido, com participação tanto do N exógeno como endógeno.

A interpretação dos resultados baseados na eliminação do enxofre e de seu radioisótopo ^{35}S , mostrou um perfil de excreção semelhante ao observado para o ^{15}N , embora em níveis levemente superiores.

SUMMARY

Studies with growing rats were carried out to determine the digestibility and nutritive value of beans (Phaseolus vulgaris, L.) Carioca variety, and their major protein fractions, after proper heat treatment in order to inactivate the antiphenological factors.

The conventional method based on weight gain and the relation between the ingested and excreted nitrogen was followed by a balance technique, employing either whole beans or their protein fractions, previously labeled with ^{15}N and ^{35}S .

The ingestion of the diets showed different nutritive responses, which were specific for each of the diets.

Low biological value and digestibility were observed by rats fed on whole bean-containing diets, and as a consequence an excretion of 34% of the ingested nitrogen was noted. This value was 3-4 times higher than the one excreted by the casein-control animals. Higher values of "weight gain" and NPR were obtained with the albumin and glutelin based diets, although their digestibilities were relatively low (70-80%). The globulin G1 was highly digestible (92%) nevertheless it appeared to have very low nutritional values and did not allow the growth of rats.

The biological assay with isotopically labeled beans and proteins, allowed to differentiate the origin of fecal nitrogen and sulfur, as exogenous or endogenous. The concentration

of ^{15}N in excess, which appeared in the feces 12 hours after the first ingestion of the labeled diets, was considered to be of exogenous origin; these values can be interpreted comparatively. The ingestion of the cooked whole beans promoted an excretion of exogenous nitrogen, 10 times higher than that excreted by the rats on the globulin G1 diet, which with the high excretion of endogenous nitrogen, totalized 34% of the ingested one. Rats fed on the globulin G1 diet excreted, in the first 12 hours, only small amounts of ^{15}N , even in the steady-state (49-69th day on feeding the labeled diet), when the excreted ^{15}N corresponded to both, exogenous and labeled endogenous excretion reached, the maximum loss (about 10% of the ingested total nitrogen). The feeding of albumin based diets stimulated an excretion of 20% of the ingested nitrogen, due to exogenous and endogenous origin.

The interpretation of the results based on the balance of total sulfur and their radioactive isotope (^{35}S) showed an excretion pattern, similar to that of the ^{15}N , although in absolute values (of excretion) it was a little higher than that representing the nitrogen loss.

11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V.C. - Influence of time and conditions of storage on technological and nutritional properties of a dry bean (Phaseolus vulgaris, L.) variety Rosinha G2. J. Food Sci., Chicago, 44:1703-6, 1979.
- ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V.C. - Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (Phaseolus vulgaris, var. Rosinha G2) proteins. J. Agric. Food Chem., Washington, 28:935-8, 1980.
- ANTUNES, P.L.; SGARBIERI, V.C.; GARRUTI, R.S. - Nutrification of dry beans (Phaseolus vulgaris) by methionine infusion. J. Food Sci., Chicago, 44:1302-5, 1979.
- ARTZ, W.E.; BISHOP, P.D.; DUNKER, A.K.; SCHANUS, G.; SWANSON, B.G. - Interaction of synthetic proanthocyanidin dimer and trimer with bovine serum albumin and purified bean globulin fraction G-1. J. Agric. Food Chem., Washington, 35:417-21, 1987.
- ASP, N.-G.; JOHANSSON, C.-G.; HALLMER, H.; SILJESTROM, M. - Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. J. Agric. Food Chem., Washington, 31:476-82, 1983.

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) Columbus, 1985.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - Official methods of analysis, 12.ed. Washington, 1975. p.927-8.

AW, T-L. & SWANSON, B.G. - Influence of tannin on Phaseolus vulgaris protein digestibility and quality. J. Food Sci., Chicago, 50:67-71, 1985.

BARKER, R.D.J.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A.; BOULTER, D. - Purification and characterization of the major storage proteins of Phaseolus vulgaris seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. Phytochemistry, New York, 15:751-7, 1976.

BENDER, A.E. & MOHAMMADIHA, H. - Low digestibility of legume nitrogen. Proc. Nutr. Soc., Cambridge, 40:66A, 1981.

BHATTY, R.S. - Albumin proteins of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and amino acid composition. J. Agric. Food Chem., Washington, 30:620-2, 1982.

BICUDO, M.H. - Efeito da casca de feijão (Phaseolus vulgaris) na utilização da caseína. Belo Horizonte, 1978. 70 p. |Dissertação Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais|.

BOONVISUT, S. & WHITAKER, J.R. - Effect of heat, amylase, and disulfide cleavage on the in vitro digestibility of soybean proteins. J. Agric. Food Chem., Washington, 24:1130-5, 1976.

BRADBPEAR, N. & BOULTER, D. - The use of enzymic hydrolysis in vitro to study the digestibility of some phaseolus seed proteins. Qual. Plant.-Foods Hum. Nutr., The Hague 34:3-13, 1984.

- BRAY, G.A. - A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem., Baltimore, 1:279-85, 1960.
- BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. - Evaluación de la calidad proteínica de varias leguminosas de grano usando diversos métodos biológicos. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 26:325-39, 1976.
- BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. - Relación entre la digestibilidad y el valor proteínico del frijol común (Phaseolus vulgaris). Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 34:189-97, 1984.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; BRAHAM, J.E. - Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. J. Plant Foods, London, 4:43-55, 1982.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; MOLINA, M.R. - Estudios sobre la digestibilidad de la proteína de varias especies de leguminosas. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 27:215-31, 1977.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; VALIENTE, T. - Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans. (Phaseolus vulgaris, L.). Br. J. Nutr., London, 17:69-78, 1963.
- CALLOWAY, D.H. & KRETSCH, M.J. - Protein and energy utilization in men given a rural Guatemalan diet and egg formulas with and without added oat bran. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, 31:1118-26, 1978.
- CHANG, K.C. & SATTERLEE, L.O. - Isolation and characterization of the major protein from Great Northern Beans (Phaseolus vulgaris). J. Food Sci., Chicago, 46:1368-73, 1981.

- COSTA DE OLIVEIRA, A. & SGARBIERI, V.C. - The influence of rat endogenous nitrogen excretion on the assessment of bean protein quality. J. Nutr. Sci., Vitaminol., Tokyo, 32:425-39, 1986b.
- COSTA DE OLIVEIRA, A.; SGARBIERI, V.C. - Effects of diets containing dry beans (Phaseolus vulgaris, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. J. Nutr., Philadelphia, 116:2387-92, 1986a.
- DA COSTA, L.R.; CROFT, D.N.; CREAMER, B. - Protein loss and cell loss from the small-intestinal mucosa. Gut, London, 12:179-83, 1971.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. - Review. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry, New York, 15:3-24, 1976.
- DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. - Nitrogenous constituents of selected grain legumes. J. Food Sci., Chicago, 52:1321-5, 1987a.
- DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. - In vitro enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of Phaseolus vulgaris, L. F. Food Sci., Chicago, 52:1326-9, 1987b.
- DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. - In vitro digestibility of dry bean (Phaseolus vulgaris, L.) proteins: the role of heat-stabile protease inhibitors. J. Food Sci., Chicago, 52:1330-4, 1987c.
- DESHPANDE, S.S. & PRADESH, A. - Tannin analysis of food products. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Cleveland, 24:401-49, 1986.
- DESHPANDE, S.S.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K.; CORNFORTH, D.P. - Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols, and enzyme inhibitors of dry beans (Phaseolus vulgaris, L.). J. Food Sci., Chicago, 47:1846-50, 1982.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, D.A.; SMITH, F. - Colorimetric methods of determination of sugars and related substances. Anal. Chem., Washington, 28:350-6, 1956,

- DURIGAN, J.F.; SGARBIERI, V.C.; BULISANI, E.A. - Protein value of dry bean cultivars: factors interfering with biological utilization. J. Agric. Food Chem., Washington, 35:694-8, 1987.
- DREYER, J.J. & van der WALT, W.H. - A system for assessment of dietary protein quality based on an updated version of the nitrogen metabolism method using young rats.
1. Determination of digestibility. S. Afr. J. Sci., Johannesburg, 80:417-23, 1984.
- ELIAS, L.G.; DE FERNANDEZ, D.G.; BRESSANI, R. - Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. J. Food Sci., Chicago, 44:524-7, 1979.
- ERICSON, M.C.; CHRISPEELS, M.J. - Isolation and characterization of glucosamine - containing storage glycoproteins from the cotyledons of Phaseolus aureus. Plant Physiol., Bethesda, 52:98-104, 1973.
- EVANS, R.J. & BAUER, D.H. - Studies of the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (Phaseolus vulgaris). J. Agr. Food Chem., Washington, 26:779-84, 1978.
- EVANS, R.J.; BAUER, D.H.; SISAK, K.A.; RYAN, P.A. - The availability for the rat of methionine and cysteine in dry bean seed (Phaseolus vulgaris). J. Agric. Food Chem., Washington, 22:130-3, 1974.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; GEE, J.M.; JOHNSON, I.T. - The influence of cooked kidney beans (Phaseolus vulgaris) on intestinal cell turnover and faecal nitrogen excretion in the rat. Br. J. Nutr., London, 49:303-12, 1983.

- FERNÁNDEZ, D.G. - Estudio sobre las posibles relaciones entre los pigmentos presentes en la cáscara de frijol y el valor nutritivo de este. Apud BICUDO, M.H. - Efeito da casca de feijão (Phaseolus vulgaris) na utilização da caseína. Belo Horizonte, 1978. 70p. |Dissertação Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais|.
- FINARDI FILHO, F. & LAJOLO, F.M. - Identificação eletroforética de inibidor de alfa-amilase em géis de poliacrilamida-amilopectina. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2:21-32, 1982.
- GALLAHER, D. & SCHNEEMAN, B.O. - Nutritional and metabolic response to plant inhibitors of digestive enzymes. Adv. Exp. Med. Biol., New York, 177:299-319, 1984.
- GRAHAM, G.G.; MORALES, E.; PLACKO, R.R.; Mac LEAN, Jr. W.C. - Nutritive value of brown and black beans for infants and small children. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, 32:2362-6, 1979.
- GREEN, G.M. & NASSET, E.S. - Role of dietary protein in rat pancreatic enzyme secretory response to a meal. J. Nutr., Philadelphia, 113:2245-52, 1983.
- GRIFFITHS, D.W. & MOSELEY, G. - The effect of diets containing field beans of high or low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestines of rats. J. Sci. Food Agric., London, 31:255-9, 1980.
- HERNANDEZ-INFANTE, M.; HERRADOR-PENA, G.; SOTELO-LOPEZ, A. - Nutritive value of different beans (Phaseolus vulgaris) supplemented with methionine. J. Agric. Food Chem., Washington, 27:965-8, 1979.

- HERRIDGE, D.V.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; RAINBIRD, R.M. -
- Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of
the Cowpea (Vigna unguiculata [L.] Walp). Plant Physiol.,
Bethesda, 62:495-8, 1978.
- INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. Committee on
laboratory animal diets. a report. Nutr. Abstr. Rev. Ser.
B, Slough, 49:413-9, 1979.
- ISHINO, K. & ORTEGA, M.L. Fractionation and characterization
of major reserve proteins from seeds of Phaseolus vulgaris.
J. Agric. Food Chem., Washington, 23:529-33, 1975.
- IVAN, M. & BOWLAND, J.P. - Digestion of nutrients in the small
intestine of pigs fed diets containing raw and autoclaved
faba beans. Can. J. Anim. Sci., Ottawa, 56:451-6, 1976.
- JAFFÉ, W.G. - Protein digestibility and trypsin inhibitor activity
of legume seeds. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 75:
219-20, 1950.
- JAFFÉ, W.G. - Hemagglutinins (lectins). In: LIENER, I.E. Toxic
constituents of plant foodstuffs. 2.ed., New York, Academic
Press, 1980. p.73-102.
- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. - Growth inhibition of rats fed raw
navy beans (Phaseolus vulgaris). J. Nutr., Philadelphia,
90:191-8, 1966.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; Mc GHEE, J.E.; PUSKI, G. - Determination
of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative
analysis of an improved procedure. Cereal Chem., Saint-Paul,
51:376-82, 1974.
- KANTHA, S.S. & ERDMAN JR, J.W. - Legume carotenoids. CRC Crit.
Rev. Food Sci. Nutr., Cleveland, 26:137-52, 1987.
- KOEHLER, R.; PAHLE, T.; GEBHARDT, G. - Absorption and utilisation
of differently structured isolated proteins by cats. Arch.
Tierernaehr., Berlin, 34:111-21, 1984.

- KRAWIELITZKI, K. - The compartment model as a method of estimating characteristic data on the resorption kinetics of amino acids. (2) Uses of the compartment model and discussion of results. Arch. Tierernaehr., Berlin, 22:563-591, 1972.
- KRAWIELITZKI, K. & BOCK, H.-D. - Problems of nitrogen metabolism in monogastric animals. Arch. Tierernaehr., Berlin, 26:83-98, 1976.
- KRAWIELITZKI, K.; SCHADEREIT, R.; VOELKER, T.; REICHEL, K. -
- Dependence of the metabolic fecal amino acids on the amino acid content of the feed. 1. Metabolic fecal amino acids of rats fed with maize. Arch. Tierernaehr., Berlin, 31: 433-46, 1981.
- KRAWIELITZKI, K. & TIM, E. - Tracerversuche mit ¹⁵N-markiertem Weizen zur Bestimmung des endogenen und exogenen faekalen N-Anteils. Arch. Tierernaehr., Berlin, 28:155-64, 1978.
- KREUZER, M. & KIRCHGESSNER, M. - Effects of type and quantity of starch in the ration on apparent and true N digestibility and on N balance of sheep. Arch. Tierernaehr., Berlin, 10: 723-31, 1985.
- KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.S.; JOERGENSEN, S.S. - Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry. Analyst, London, 102:503-8, 1977.
- KRUG, F.J.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; BAHIA FILHO, O.; JACINTHO, A.O.; JOERGENSEN, S.S. - Turbidimetric determination of sulphate in plant digests and natural waters by flow injection analysis with alternating streams. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 145:179-87, 1983.

LAJOLO, F.M. - Inibidor de amilase do (Phaseolus vulgaris): estudo bromatológico. São Paulo, 1977, 133p. |Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo|.

LAJOLO, F.M. & FINARDI FILHO, F. - Purificação do inibidor de alfa-amilase do feijão preto (Phaseolus vulgaris) var. Rico 23. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 4:1-11, 1984.

LANFER MARQUEZ, U.M. - Digestibilidade e características bioquímicas de proteínas do Phaseolus vulgaris, L., São Paulo, 1979, 108p. |Dissertação Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo|.

LANFER MARQUEZ, U.M. & LAJOLO, F.M. - Composition and digestibility of albumin, globulin, and glutelins from Phaseolus vulgaris. J. Agric. Food Chem., Washington, 29:1068-74, 1981.

LASKOWSKI JR, M. & KATO, I. - Protein inhibitors of proteinases. Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, 49:593-626, 1980.

LAURENA, A.C.; GARCIA, V.V.; MENDOZA, E.M.T. - Effects of soaking in aqueous acidic and alkali solutions on removal of polyphenols and in vitro digestibility of cowpea. Qual. Plant.-Plant Foods Hum. Nutr., The Hague, 36:107-18, 1986.

LIEBERT, F. & GEBHARDT, G. - Investigations into the influence of cellulose and various kinds of starch in the feed on nitrogen metabolism in growing pigs. Arch. Anim. Nutr., Berlin, 36:35-44, 1986.

LIENER, I.E. - The photometric determination of hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. Arch. Biochem. Biophys., New York, 54:223- 31, 1955.

LIENER, I.E. - Legume toxins in relation to protein digestibility - a review. J. Food Sci., Chicago, 41:1076-81, 1976.

LIENER, I.E. - Trypsin inhibitors: Concern for human nutrition or not ? J. Nutr., Philadelphia, 116:920-3, 1986.

LIENER, I.E. & THOMPSON, R.M. - In vitro and in vivo studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (Phaseolus vulgaris). Qual. Plant. - Plant Foods Hum. Nutr., The Hague, 30:13-25, 1980.

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

MA, Y. - Improvement of nutritive value of dry bean seeds (Phaseolus vulgaris, L.), (s.l.p.). 1977. 105p. [Tese de Doutorado - University of Wisconsin - Madison].

MCLEESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M.; BLISS, F.A. - Comparison of globulin proteins from Phaseolus vulgaris with those from Vicia faba. Phytochemistry, New York, 2:85-93, 1973.

MENEZES, E.W. & LAJOLO, F.M. - Inhibition of starch digestion by a black bean α -amylase inhibitor in normal and diabetic rats. Nutr. Rep. Int., Los Altos, 36:1185-95, 1987.

MIFLIN, B.J., ed. Amino acids and derivatives, New York, Academic Press, 1980. 670p. [The Biochemistry of plants, v.5].

MITCHELL, H.H. - A method of determining the biological value of protein. J. Biol. Chem., Baltimore, 58:873-903, 1924.

MITCHELL, H.H. & BERT, M.H. - The determination of metabolic fecal nitrogen. J. Nutr., London, 52:483-97, 1954.

MORAES e SANTOS, T. & DUTRA DE OLIVEIRA, J.F. - Valor nutritivo de frações protéicas isoladas de feijão (Phaseolus vulgaris). Arch.Latinoam. Nutr., Caracas, 22:547-60, 1972.

NASSET, E.S. - Amino acid homeostasis in the gut lumen and its nutritional significance. World Rev. Nutr. Diet., New York, 14:134-153, 1972.

NASSET, E.S. & JU, J.S. - Mixture of endogenous and exogenous protein in the alimentary tract. J. Nutr., Philadelphia, 74:461-5, 1961.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: NUTRIENT requirements of laboratory animals. 2. ed. Washington, National Academy of Sciences, 1972. p.56-93. (Nutrient requirements of domestic animals, 10).

NAVARRETE, D.A. & BRESSANI, R. - Protein digestibility and protein quality of common beans (Phaseolus vulgaris) fed alone and with maize, in adult humans using a short-term nitrogen balance assay. Am. J. Clin. Nutr., New York, 34:1893-1898, 1981.

NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. - Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs. 2.ed. Homewood, Richard D. Irwin, 1985. 1127p.

PADHYE, V.W. & SALUNKHE, D.K. - Biochemical studies on black gram (Phaseolus mungo L.) seeds: amino acid composition and subunit constitution of fractions of the proteins. J. Food Sci., Chicago, 44:606-14, 1979.

- PARTRIDGE, I.G.; SIMON, O.; BERGNER, U. - The passage and absorption of dietary and endogenous nitrogen in different regions of the digestive tract of rats given a single meal of ^{15}N - labelled barley. Arch. Tierernaehr., Berlin, 35: 163-73, 1985.
- PROKSCH, G. - Routine analysis of nitrogen-15 in plant material by mass-spectrometry. Plant Soil, The Hague, 31(2):380-4, 1969.
- PUSZTAI, A. & PALMER, R. - Nutritional evaluation of kidney beans (Phaseolus vulgaris): the toxic principle. J. Sci. Food Agric., London, 28:620-623, 1977.
- PUSZTAI, A. & WATT, W.B. - The isolation and characterization of a major antigenic and non-haemagglutinating glycoprotein from Phaseolus vulgaris. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 20:413-431, 1970.
- REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, O.K. - Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates - a review. Food Chem., Barking, 13:25-68, 1984.
- RERAT, A.P.; VAUGELADE, P.; VILLIERS, P. - Digestion and absorption of nutrients in the pig. In: Low, A.G., Partridge, I.G. Current concepts of digestion on absorption in pigs. Nird, Reading, Techn. Bull. n^o 3, 1980. Apud: KRAWIELITZKI, K., SCHADEREIT, R.; ZEBROWSKA, T.; WÜNSCHE, J.; BOCK, H.D. Arch. Tierernaehr., Berlin, 34:1-18, 1984.
- RICHARDSON, M. - Protein inhibitors of enzymes. Food Chem., Barking, 6:235-53, 1980-1981.
- ROGERS, A.E. - Nutrition. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. - The laboratory rat, New York, Academic Press, 1979. v.1, p.123-152.

- ROMERO, R. & RYAN, D.S. - Susceptibility of the major storage protein of the bean, Phaseolus vulgaris L., to in vitro enzymatic hydrolysis. J. Agric. Food Chem., Washington, 26:784-8, 1978.
- ROMERO, J.; SUN, S.M.; MCLEESTER, R.C.; BLISS, F.A.; HALL, T.C. - Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, Phaseolus vulgaris, L. Plant Physiol., Bethesda, 56:776-9, 1975.
- RONNENCAMP, P.R. - The effect of tannins on nutritional quality of dry beans. Phaseolus vulgaris. (s.l.p.), 1977. 52p. |Tese de Doutoramento - Purdue University|.
- ROSALES ARZÚ, A.M. - Estudio sobre la calidad proteínica del frijol y la de tres fracciones derivadas por solubilidad diferencial in niños preescolares. Apud BRESSANI, R. et al. Estudios sobre la digestibilidad de la proteína de varias especies de leguminosas. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 27:215-31, 1977.
- SALTER, D.N. - The influence of gut micro-organisms on utilization of dietary protein. Proc. Nutr. Soc., Cambridge, 32:65-71, 1983.
- SANDARADURA, S.S. & BENDER, A.E. - The effect of cooked legumes on mucosal cell turnover in the rat. Proc. Nutr. Soc., Cambridge, 43:89A, 1984.
- SARWAR, G. & PEACE, R.W. - Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats. J. Nutr., Philadelphia, 116:1172-84, 1986.

- SATHE, S.K. & SALUNKHE, D.K. - Solubilization and electrophoretic characterization of the Great Northern Bean (Phaseolus vulgaris, L.) proteins. J. Food Sci., Chicago, 46:82-7, 1981.
- SATHE, S.K.; IYER, V.; SALUNKHE, D.K. - Functional properties of the Great Northern bean (Phaseolus vulgaris, L.) proteins. Amino acid composition, in vitro digestibility, and application to cookies. J. Food Sci., Chicago, 47:8-11, 15, 1982.
- SCHROEDER, H.F. - Major albumins of Pisum cotyledons. J. Sci. Food Agric., London, 35:191-8, 1984.
- SCHUBERT, K.R. - Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in Glycine max. I. Comparison of activities with N₂ fixation and composition of xylem exsudate during nodule development. Plant Physiol., Bethesda, 68:1115-22, 1981.
- SEIDL, D.; JAFFÉ, M.; JAFFÉ, W.G. - Digestibility and proteinase inhibitory action of a kidney bean globulin. J. Agric. Food Chem., Washington, 17:1318-21, 1969.
- SEMINO, G.A.; RESTANI, P.; CERLETTI, P. - Effect of bound carbohydrate on the action of trypsin on lupin seed glycoproteins. J. Agric. Food Chem., Washington, 33:196-9, 1985.
- SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L.; ALMEIDA, L.D. - Nutritional evaluation of four varieties of dry beans. (Phaseolus vulgaris, L.). J. Food Sci., Chicago, 44:1306-8, 1979.
- SGARBIERI, V.C.; CLARKE, E.M.W.; PUSZTAI, A. - Proteolytic breakdown of kidney bean (Phaseolus vulgaris) storage proteins: Nutritional implications. J. Sci. Food Agric., London, 33: 881-91, 1982.

- SGARBIERI, V.C. & WHITAKER, J.R. - Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (Phaseolus) proteins. Adv. Food Res., New York, 28:93-166, 1982.
- SINGH, U. - The inhibition of digestive enzymes by polyphenols of chick pea (Cicer arietinum L.) and pigeon pea (Cajanus cajan (L.) Millsp.). Nutr. Rep. Int., Los Altos, 29:745-53, 1984.
- SLUMP, P. & VAN BEEK, L. - Amino acids in feces related to digestibility of food proteins. In: FRIEDMAN, M., ed. Protein nutritional quality of foods and feeds. New York, Marcel Dekker, 1975. part 1, p. 67-78.
- SOSULSKI, F.W. & HOLT, N.W. - Amino acid composition and nitrogen to protein factors for grain legumes. Can. J. Plant Sci., Ottawa, 60:1327-1331, 1980.
- SOUFFRANT, W.B.; DARCY-VRILLON, B.; CORRING, T.; LAPLACE, J.D.; KÖHLER, R.; GEBHARDT, G.; RERAT, A. - Recycling of endogenous nitrogen in the pig (preliminary results of a collaborative study). Arch. Anim. Nutr., Berlin, 36:269-274, 1986.
- SOUFFRANT, W.B.; KÖHLER, R.; GEBHARDT, G. - Investigations of the absorption of protein-linked N and synthetic methionine in the small intestines of pigs. Arch. Tierernaehr. Berlin 31:609-17, 1981.
- SUN, S.M. & HALL, T.C. - Solubility characteristics of globulins from Phaseolus seeds in regard to their isolation and characterization. J. Agric. Food Chem., Washington, 23:184-9, 1975.
- TAMIR, M. & ALUMOT, F. - Carob tannins - Growth depression and levels of insoluble nitrogen in the digestive tract of rats. J. Nutr., London, 100:573-80, 1970.

- TRIPLETT, E.W. - Two indirect methods for detecting ureide synthesis by nodulated legumes. Plant Physiol., Bethesda, 81:566-71, 1986.
- TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUE, E! - Preparo de amostras para análise de nitrogênio-15 por espectrometria de massa. Piracicaba, Cena, 1973, 41p. (Boletim Técnico nº 002).
- VAINTRAUB, I.A. & SAYANOVA, O. - Effect of kidney bean 7S protein on the proteolytic activity of trypsin. Izo. Akad. Nauk. Mold. SSR Ser. Biol. Khim. Nauk, 3:24-27. Apud. Chem. Abstr., Columbus, 87:147840d, 1977.
- VAINTRAUB, I.A.; SELIGER, P.; SHUTOV, A.D. - The action of pepsin on the reserve proteins of some leguminous seeds. Nahrung, Berlin, 23:15-21, 1979.
- ZEBROWSKA, T. & LOW, A.G. - The influence of diets based on whole wheat, wheat flour and wheat bran on exocrine pancreatic secretion in pigs. J. Nutr., Philadelphia, 117:1212-16, 1987.
- ZEBROWSKA, T.; SIMON, O.; MUENCHMEYER, R.; BERGNER, H. - Studies on the amino acid absorption and the secretion of endogenic amino acids into the gastro-intestinal tract of pigs. Arch. Tierernaehr, Berlin, 26:69-82, 1976.
- ZIMMER, M.; BERGNER, N.; SIMON, O. - Absorption and incorporation of labelled amino acids in rats fed various protein sources 1. Absorption of ¹⁴C-leucine and ³H-glycine in rats after intragastric administration. Arch. Tierernaehr., Berlin, 25:311-26, 1975.

12 - APÊNDICE

LISTA DE FIGURAS

Figura

- 1 - Curvas de peso de ratos alimentados com rações de caseína e proteínas do feijão (10% de proteína)..... 48
- 2 - Efeito da ingestão das rações contendo feijão integral ou suas proteínas isoladas, sobre a excreção fecal de matéria seca e de nitrogênio..... 69
- 3 - Excreção fecal de ^{15}N (% da ingestão média diária), doze horas após o início da ingestão da ração marcada e na fase de equilíbrio (4º ao 6º dia da experiência)..... 74
- 4 - Curvas de excreção fecal de ^{15}N (% da ingestão média diária) dos animais (n=4) alimentados com feijão integral, albuminas e globulina Gl..... 77
- 5 - Redução da concentração de ^{15}N nas fezes, durante a fase de decaimento (6º-12º dia), dos animais alimentados com feijão integral, albuminas e globulina Gl..... 78
- 6 - Curvas de excreção fecal de ^{35}S (% da ingestão média diária), dos animais (n=4) alimentados com feijão integral, albuminas e globulina Gl..... 81

Figura

- 7 - Redução da atividade isotópica do ^{35}S nas fezes, durante a fase de decaimento (6º-12º dia), dos animais alimentados com feijão integral, albumina e globulina G1..... 82
- 8 - Efeito da ingestão de rações contendo feijão integral, albuminas ou globulina G1, marcados isotopicamente, sobre a excreção de nitrogênio e enxofre..... 84

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela

- 1 - Teor de nitrogênio total ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$), nas fontes protéicas e nas rações experimentais..... 38
- 2 - Teor de ^{15}N nas fontes protéicas e nas rações experimentais..... 39
- 3 - Teor de enxofre total nas fontes protéicas e nas rações experimentais..... 40
- 4 - Atividade do ^{35}S nas fontes protéicas e nas rações experimentais..... 40
- 5 - Experiência 1. Digestibilidade e "NPR" (utilização protéica líquida) das proteínas isoladas do feijão. (Ensaio de 7 dias de duração)..... 46
- 6 - Experiência 2. Digestibilidade e "NPR" (utilização protéica líquida) do feijão, e do feijão suplementado com a fração albumínica. (Ensaio de 13 dias de duração).... 47
- 7 - Experiência 3. Digestibilidade e "NPR" (utilização protéica líquida) do feijão integral e de suas proteínas isoladas. (Ensaio de 12 dias de duração)..... 51
- 8 - Experiência 3. Ensaio do feijão integral: Ingestão e excreção fecal diárias de nitrogênio total (^{14}N e ^{15}N) e ^{15}N 53

Tabela

- 9 - Experiência 3. Ensaio da fração albumínica: Ingestão e excreção fecal diárias de nitrogênio total (^{14}N e ^{15}N) e de ^{15}N 54
- 10 - Experiência 3. Ensaio da fração globulina G1: Ingestão e excreção fecal diárias de nitrogênio total (^{14}N e ^{15}N) e de ^{15}N 55
- 11 - Experiência 3. Ensaio do feijão integral: Ingestão e excreção fecal diárias de enxofre total e de ^{35}S . .. 57
- 12 - Experiência 3. Ensaio da fração albumínica: Ingestão e excreção fecal diárias de enxofre total e de ^{35}S . .. 58
- 13 - Experiência 3. Ensaio da globulina G1: Ingestão e excreção fecal diárias de ^{35}S 59

Quadro

- I - Relação entre a excreção fecal e o teor de fibra da dieta..... 68
- II - Diluição isotópica do ^{15}N das rações pela passagem no trato gastro-intestinal dos animais. 72
- III - Diluição isotópica do ^{35}S das rações pela passagem no trato gastro intestinal dos animais. 80