

*Final,*  
VARIAÇÃO DE METIONINA EM FEIJÕES (Phaseolus vulgaris, L)

ARMAZENADOS

Por

Eliana Badiale

Tese apresentada para obtenção

do título de Mestre em

Ciência de Alimentos

Dr. Jaime Amaya-Farfan

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola

Universidade Estadual de Campinas

1979

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jaime Amaya-Farfan pela orientação deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP pela possibilidade de realizar esta pesquisa.

À Adelaide M. S. da Costa, Maria Lúcia Setina e Denis Cantú Lozano pela colaboração.

À Walter Augusto Ruiz por ter confiado em mim.

À Arlete Pereira Moura por sua amizade.

A todos os colegas e amigos que me apoiaram durante o tempo deste trabalho.

## ÍNDICE

Página

RESUMO

SUMMARY

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Leguminosas.....	4
2.1.1. Valor Nutritivo da Espécie <u>P. vulgaris</u> , L.	4
2.1.1.1. Composição Centesimal.....	4
2.1.1.2. Fatores que influem no valor biológico.....	7
2.1.1.3. Fatores antinutricionais.....	9
2.2. Metionina.....	11
2.2.1. Importância no metabolismo.....	11
2.2.2. Reações Analíticas Características.....	14
2.2.3. Estados de oxidação de metionina e sua utilização.....	15
2.2.4. Disponibilidade de metionina.....	17
2.2.5. Problemas na determinação de metionina...	21
2.3. Métodos propostos para determinação de metionina	22
2.3.1. Métodos químicos.....	22
2.3.2. Métodos biológicos.....	28
3. Material e Métodos.....	32
3.1. Amostras.....	32
3.1.1. Preparação de amostras.....	33

3.1.2. Armazenamento de amostras.....	34
3.1.3. Caracterização bromatológica das amostras.	34
3.1.3.1. Umidade.....	34
3.1.3.2. Proteína.....	34
3.1.3.3. Composição de Aminoácidos.....	35
3.2. Determinação da Metionina.....	36
3.2.1. Estudo dos parâmetros que influem na hidrólise.....	36
3.2.1a Escolha da enzima.....	36
3.2.1.1. Determinação da atividade enzimática.....	36
3.2.1.1.1. Precipitação com TCA.	37
3.2.1.1.2. Reação colorimétrica de McCarthy e Sullivan...	37
3.2.1.2. Estudo do cociente enzima/substrato.....	38
3.2.1.3. Estudo do efeito do modo de adição de enzima.....	38
3.2.1.4. Estudo do tempo de hidrólise.....	40
3.2.2. Testes para eliminar ou diminuir a interferência dos inibidores da proteólise.....	40
3.2.2.1. Desnaturação térmica.....	40
3.2.2.2. Tratamento prévio com ácido.....	41
3.2.2.3. Modificação do método de hidrólise.....	42
3.2.3. Estudo da reação colorimétrica.....	43
3.2.3.1. Efeito da concentração do ácido..	43
3.2.3.2. Efeito da concentração do nitroprussiato do sódio.....	43
3.2.3.3. Curvas padrão dos estados.....	44

3.3. Método modificado para avaliação de metionina quimicamente disponível. Procedimento final....	44
3.3.1. Hidrólise enzimática.....	45
3.3.2. Reação colorimétrica.....	45
3.4. Método usado por Moreira et al.....	46
3.5. Determinação de metionina e cisteína total por oxidação.....	47
3.5.1. Preparação de padrões.....	47
3.5.2. Preparação de amostras.....	47
3.6. Digestibilidade de amostras armazenadas.....	48
4. Resultados e Discussão.....	50
4.1. Composição centesimal.....	50
4.2. Escolha de determinação de metionina.....	59
4.3. Padronização das condições de reação.....	61
4.3.1. Hidrólise enzimática.....	61
4.3.1.1. Atividade enzimática.....	62
4.3.1.2. Estudo das condições de hidrólise.....	64
4.3.1.3. Testes para eliminar ou diminuir a interferência dos inibidores da proteólise.....	65
4.3.1.4. Modificação do método de hidrólise.....	65
4.3.1.5. Modificação da reação colorimétrica.....	70
4.4. Determinação da metionina em doze variedades de feijões ( <u>Phaseolus vulgaris</u> , L).....	73
4.4.1. Avaliação de metionina total.....	73
4.4.2. Avaliação estatística da variação de "me-	

tionina complexável" na doze variedades de feijão ( <u>Phaseolu vulgaris</u> , L).....	79
5. Conclusões.....	84
6. Bibliografia	

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1.

Composição de aminoácidos de doze variedades de feijões  
brasileiros (mg/g proteína)..... 6

TABELA 2.

Parcelamento do modo de adição da enzima..... 39

TABELA 3.

Porcentagem de proteína dos feijões em base seca em fun-  
ção do tempo de estocagem (dias)..... 51

TABELA 4.

Porcentagem de umidade dos feijões em função do tempo  
de estocagem (dias)..... 53

TABELA 5.

Análise de variância da porcentagem de umidade x tempo  
de armazenamento..... 56

TABELA 6.

Composição de aminoácidos totais em doze variedades de



feijões brasileiros (mg/g de proteína - média de duas determinações.....)	58
---	----

## TABELA 7.

Determinação de metionina e cisteína total pelo método de oxidação com ácido perfórmico.....	76
--	----

## TABELA 8.

Metionina determinada segundo o método modificado de Tannenbaum e por oxidação total com ácido perfórmico...	77
--	----

## TABELA 9.

Média de "metionina complexável" . (mg/g proteína) durante o armazenamento (dias).....	78
--	----

## TABELA 10.

Análise de variância da "metionina complexável" de feijões (variedades x tempo).....	79
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.	
Variação média da porcentagem de umidade das doze variedades de feijão com o tempo de armazenamento.....	54
FIGURA 2.	
Atividade enzimática da Protease de <u>S. griseus</u> .....	63
FIGURA 3.	
Aumento da atividade enzimática da Protease de <u>S. griseus</u> com o pré-tratamento ácido.....	66
FIGURA 4.	
Efeito do tempo de hidrólise na quantidade de metionina detectada.....	69
FIGURA 5.	
Curvas padrão dos estados de oxidação da metionina (método de Tannenbaum modificado).....	72
FIGURA 6.	
Cromatograma da separação de ac. cisteico e sulfona de	

metionina por analizador de aminoácidos (modelo Beckman 120 C).....	75
--	----

## RESUMO

O objetivo deste trabalho é testar o método químico do ferricianeto de sódio na sua capacidade de dosar a "metionina quimicamente disponível" em doze variedades de feijão (Phaseolus vulgaris, L) em função do tempo de armazenamento.

O interesse em determinar metionina reside no fato de que este é um aminoácido essencial que limita o valor nutritivo de toda semente leguminosa por se encontrar em pequenas quantidades ou por não estar nutricionalmente disponível: ou seja, o mesmo não pode ser aproveitado como fonte de enxofre para os animais devido a oxidação ou alquilação excessiva do grupamento tiometila do aminoácido. Segundo alguns autores este é um processo que pode ocorrer durante a estocagem de grãos.

A aplicação de diversos procedimentos disponíveis não tem tido sucesso, fazendo necessário que se adapte o método do ferricianeto. Para evitar a instabilidade das formas parcialmente oxidadas, por exemplo, hidrólise enzimática com protease de Streptomyces griseus foi usada. A resistência especial que as proteínas de feijão oferecem a proteases tornou necessário alte-

rar as condições de hidrólise, tais como pH da solução e tempo de hidrólise. Posteriormente foi necessário usar ácido clorídrico 8 N ao invés de ácido concentrado na reação colorimétrica para melhorar a cor obtida.

Uma vez otimizadas todas as condições, determinou-se a metionina complexável com ferricianeto de sódio nas doze variedades de feijão antes de serem submetidas ao armazenamento. Estes resultados foram comparados com os obtidos segundo o método de oxidação com ácido perfômico ("Metionina total"), não se encontrando diferença significativa quando foi considerado o total das doze linhagens. No entanto, três linhagens apresentaram baixa porcentagem de metionina complexável, foram elas: Goia no Precoce (44,4%), SP 7052 (39,8%) e SC 7010 (38,8%).

As doze variedades de feijão foram armazenadas a 80% de umidade relativa e uma temperatura que oscilou entre 20 e 26° C, durante oito meses, que ocasionava uma diminuição da metionina "quimicamente disponível".

O método adaptado demonstrou que a quantidade de metionina complexável diminuiu em todas as variedades com o decorrer do tempo, o que está de acordo com outros trabalhos que mostram perdas semelhantes mediante ensaios biológicos. As linhagens de maior estabilidade ou capacidade a estocagem Piratã II, Piratã I e Cara Suja.

## SUMMARY

The purpose of the present study was to test the sodium ferricyanide reagent in its ability to measure chemically available methionine in twelve experimental and commercial lines of common beans (Phaseolus vulgaris, L.) as a function of storage.

Our interest in accurately determining methionine in beans comes from the fact that this amino acid occurs in limiting amounts in all legumes and often only a fraction of it is biologically available. Such low availability of the essential amino acid is most likely a result of excessive oxidation and substitution of the sulfur atom; a process that has been suggested to take place during the storage of seeds.

Due to the lack of success in the application of the several procedures available, it was necessary to adapt the ferricyanide methodology. In order to circumvent the instability of the partly oxidized forms, for example, enzymatic hydrolysis with Streptomyces griseus protease was used. The special resistance that bean proteins pose to protease however,

made it necessary to alter of hydrolytic conditions such as pH of solution and time. Furthermore there was a need to use 8 N hydrochloric acid instead of concentrated acid in the colorimetric reaction to improve the color yield.

Once the analytical conditions were optimized, the ferricyanide-complexing methionine was determined in the twelve types of unstored beans. No significant difference was observed between the results thus found and those obtained the performic acid-oxidation ("total methionine") method when all the varieties were considered together. It was evident, however, that in the varieties Goiano Precoce, SP 7052 and SC 7010 only 44.4, 39.8 and 38.8% of their total methionine was complexable, respectively at the begining of the storage.

The seeds were stored at 80% relative humidity and a temperature that varied between 20 and 26°C for a total period of eight months. During this time the modified methodology demonstrated that complexing methionine decreased in all varieties. This finding was in agreement with results from other author who showed methionine losses by biological assays in beans stored under similar conditions. The lines that exhibited greater stability and/or "endurance" to storage were Piratã II, Piratã I and Cara Suja, respectively.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido a dificuldade de obtenção de proteínas animais a maior parte da população tem no feijão a sua principal fonte proteica. O feijão tem alto conteúdo protéico e um bom perfil de aminoácidos essenciais, porém, seu valor nutritivo é diminuído pela deficiência em aminoácidos sulfurados (Cirilli et al., 1974). A carência de metionina numa fonte proteica é um fator mais importante que a deficiência de lisina no valor biológico de uma proteína (Said e Hegsted, 1969).

Existe portanto um certo interesse em determinar a metionina biologicamente disponível presente num alimento, pois além dela se encontrar em pequenas quantidades em muitos alimentos de uso comum, também pode não estar nutricionalmente disponível. A perda de disponibilidade de metionina é atribuída a uma alteração do grupo tiometila da cadeia lateral do aminoácido que pode ser devida a oxidação ou alquilação do átomo de enxofre.

A metionina pode ser encontrada em diferentes estados de oxidação: metionina reduzida, sulfóxido de metionina e sulfona de metionina. De acordo com informações da literatura as formas oxidadas são menos eficientes como fonte de enxofre para os



organismos. É portanto interessante, não só para os nutricionistas como para os químicos analíticos encarregados do controle de qualidade de alimentos e rações, distinguir entre as diferentes formas de metionina presentes no alimento.

O problema na determinação do estado de oxidação do átomo de enxofre é a instabilidade da forma parcialmente oxidada em meio ácido. Portanto, em condições de hidrólise normal, o sulfóxido de metionina é reduzido novamente a metionina, que não pode ser distinguida da inicialmente presente no alimento. Durante o processo de evaporação dos hidrolisados a metionina, o sulfóxido e a sulfona de metionina estão em proporções sempre variáveis e ainda podem aparecer em pequenas quantidades produtos de transmetilação.

McCarthy e Sullivan (1941) utilizaram um reagente específico para metionina na sua forma reduzida, o nitroprussiato de sódio. Tem sido propostas modificações no método para eliminar o problema da instabilidade do sulfóxido e quase todas incluem uma hidrólise enzimática do alimento antes de se efetuar a reação colorimétrica. Destas modificações, a de Tannenbaum et al., (1969) é aparentemente a mais interessante porque considera as diversas formas de oxidação do aminoácido.

Este procedimento de Tannenbaum está limitado a pro-

teínas com alto teor de metionina, mas é necessário que se faça readaptações e otimização para proteínas com baixo teor de metionina, como é o caso do feijão.

Assim os objetivos deste trabalho foram:

1º) Readaptar e otimizar um método químico que utiliza o ferricianeto de sódio na sua capacidade de dosar quimicamente metionina disponível em doze variedades de feijão (Phaseolus vulgaris, L).

2º) Determinar metionina e cisteína total nestas variedades através de oxidação com ácido perfórmico.

3º) Avaliar o efeito do tempo de armazenamento na disponibilidade química do aminoácido essencial.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. LEGUMINOSAS

As sementes de leguminosas possuem em média duas vezes mais proteína que os grãos cereais, e daí sua utilização como base proteica nos hábitos alimentares de muitos países. Dos seiscentos gêneros compreendidos na família das leguminosas, apenas vinte deles tem importância econômica e são consumidos em todo o mundo, variando a espécie preferida em função dos hábitos regionais.

Na América Latina a espécie mais consumida é a Phaseolus vulgaris, L., em todas as variedades e cores. No Brasil, além desta espécie, a espécie Vigna sinensis é bastante apreciada (Elias et al., 1973; Freitas Filho, 1971; Dutra de Oliveira, 1973).

#### 2.1.1. Valor Nutritivo da Espécie Phaseolus vulgaris, L

##### 2.1.1.1. Composição Centesimal

De doze variedades comumente consumidas no Brasil, a composição centesimal média determinada por Moraes e Angelucci (1971) foi: umidade 11%, cinzas 3.5%, proteína 25%, amido 40%, fibra bruta 4%, pentosanas 7% e ácidos graxos 1%. Dos componentes centesimais determinados, a porcentagem proteica foi a que apresentou maior variabilidade, oscilando entre 20 e 31%. Portanto em relação a outras sementes vegetais o conteúdo proteico das sementes de feijão é alto.

Os cotilédones das sementes de feijão contribuem com 27% do conteúdo total de proteína, o eixo embrionário contribue com 48% e os restantes 5% são fornecidos pelas outras subcamadas das sementes. A classe de proteína que predomina nos feijões são as globulinas, onde está contida a maior porcentagem relativa de metionina presente, de acordo com Silva e Iachan (1975).

Segundo Zucas et al. (1966) a composição centesimal de feijão se aproxima do ideal com respeito as exigências nutricionais do homem, mas a fração lipídica está abaixo do padrão de referência.

O conteúdo médio de aminoácidos essenciais (em mg/g de proteína) das variedades analisadas por Moraes e Angelucci (1971) variou da seguinte forma: lisina 72 - 106, treonina 46 - 61, valina 33 - 118 e triptofano 103 - 138.

Pela tabela 1 pode-se ver a composição de aminoácidos das doze variedades de feijões brasileiros estudados no trabalho referido acima, em miligramas por grama de proteína em base seca. Estes conteúdos foram encontrados utilizando o analisador de aminoácidos modelo Beckman 120 C, após a hidrólise dos grãos de feijão de acordo com o procedimento descrito no manual Beckman de instruções.

Comparando os dados da tabela 1 com uma tabela de requerimentos de aminoácidos padrão da FAO pode-se verificar que os feijões são boas fontes de lisina e treonina e que o aminoácido limitante é a metionina. Sayanova e Sumenkova (1977) estudando a composição de diferentes variedades de leguminosas encontraram que as sementes de Phaseolus vulgaris, além de deficientes em metionina também tinham um baixo conteúdo de valina e isoleucina.

TABELA 1: Composição de amoníacos de doze variedades de feijões brasileiros (mg/g prot.)

Aa	Bico de		Goiano		Mulati		Rico Preto		Chumbi		Roxi-		Cario
	Ouro	Jalo	Precoce	nho	23	G.1	Pintado	Rho Opaco	Rosinha	Roxão	nho	ca	
Lis	83.7	93.3	87.5	106.1	82.0	78.1	78.6	106.2	86.9	87.5	85.4	72.4	
His	30.4	31.2	30.0	41.2	37.4	33.6	39.1	45.1	39.6	38.2	43.6	33.6	
NH4	33.5	38.4	86.6	42.7	36.6	37.1	30.3	47.0	36.6	34.6	36.1	32.8	
Arg	66.5	78.2	59.3	88.1	80.0	65.8	54.8	89.1	79.5	87.9	77.2	78.2	
ASP	126.9	119.4	120.7	133.6	127.7	108.4	120.4	151.5	134.7	134.4	126.7	143.0	
Tre	54.1	59.1	52.1	55.1	52.0	46.2	50.9	61.6	58.1	52.7	51.8	51.7	
Ser	67.0	62.6	57.6	60.8	59.8	49.7	64.8	76.4	71.7	66.6	64.9	63.9	
Glu	162.8	151.0	129.2	159.3	173.0	139.9	161.9	195.1	172.0	179.9	166.2	158.8	
Pro	45.4	42.3	30.7	39.4	48.0	46.2	45.8	52.0	54.3	51.0	49.9	47.3	
Gli	47.2	48.7	38.9	53.0	46.5	28.8	44.6	52.4	48.1	48.6	51.3	46.2	
Ala	56.8	43.3	40.4	38.1	49.4	34.2	53.5	59.4	56.0	57.8	56.4	54.4	
Cis	63.6	36.1	33.2	39.1	43.6	25.7	16.9	43.4	49.0	54.4	48.4	9.8	
Val	51.6	43.1	37.0	47.0	38.0	29.7	43.4	49.0	54.4	51.2	48.8	50.1	
Met	18.6	8.6	7.5	10.9	9.1	13.9	8.5	8.3	10.5	8.5	9.8	3.5	
Iso	44.9	49.2	38.6	49.0	43.9	28.6	42.5	49.8	46.3	47.7	44.0	32.1	
Leu	80.0	77.0	61.4	83.3	77.8	47.4	77.2	88.8	82.0	83.0	76.0	73.5	
Tir	35.9	24.7	23.7	30.9	30.0	18.1	26.1	32.1	36.0	37.7	28.6	28.1	
Fen	56.0	46.2	33.4	68.1	52.9	37.8	118.1	65.1	60.8	59.5	61.5	55.9	
Try	138.1	116.1	103.3	119.1	115.4	127.7	135.7	130.2	124.0	110.2	100.1	129.2	

Como é o caso de todas as sementes o teor de aminoácidos vai depender da variedade, do local de origem, das práticas de cultivo e outros fatores. Sabe-se, por exemplo, que a suplementação do solo com zinco pode aumentar o teor de metionina da semente (Litzenberg, 1973). Estas variações se apresentam como resultado da mudança das proteínas de reserva e não das proteínas embrionárias, que são mais constantes na sua composição.

#### 2.1.1.2. Fatores que Influem no Valor Biológico

As leguminosas, por possuírem proteínas ricas em lisina são um complemento natural dos cereais para consumo humano, pois ambos em mistura resultam num bom balanceamento de aminoácidos essenciais e ainda fornecem um conteúdo energético mais elevado e apropriado à dieta.

De acordo com Bressani, Flores e Elias (1973) o valor biológico do feijão (Phaseolus vulgaris, L) quando administrado a dequadamente tratado está ao redor de 62-68%, que pode ser considerado bom para uma proteína vegetal. Ainda segundo estes mesmos autores, a mistura de feijão e arroz apresenta um valor biológico máximo quando o arroz fornece em torno de 60 a 65% da proteína total.

A principal restrição ao valor nutritivo das leguminosas é o seu baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, como tem sido verificado em diversos trabalhos de determinação da composição de leguminosas (Evans e Bandener, 1967; Moraes e Angelucci, 1971; Kapoor, 1972; Litzenberg, 1973; Meiners et al., 1976).

Outro fator que limita o aproveitamento biológico de leguminosas é a sua baixa digestibilidade. São duas as justificativas para a baixa digestibilidade: a passagem rápida dos grãos cozidos pelo tubo digestivo impedindo a ação de enzimas proteolíticas ou as proteínas dos grãos são resistentes à proteólise en-

zimática.

Os feijões estão entre os alimentos mais estáveis, contando com poucos estudos sobre a variação da qualidade deles durante o armazenamento. Sabe-se no entanto que a umidade relativa do local de armazenamento é um fator importante pois pode afetar as características físico-químicas, organolépticas e culinárias implicando em alterações no valor biológico do alimento (Morris e Wood, 1956).

Grange et al., (1973) observaram que durante o armazenamento de Phaseolus vulgaris ocorria o aparecimento de algumas enzimas e o desaparecimento de outras enzimas, fato este que deve estar relacionado com o processo de maturação das sementes. Estas alterações irão afetar as propriedades do feijão influenciando assim no aproveitamento biológico dos feijões.

Estudando o efeito do armazenamento nas interrelações entre o tempo de maceração, tempo de cozimento e valor nutritivo das proteínas de feijão, Molina et al., (1974, 1975, 1976.) observaram uma diminuição da qualidade proteica com o armazenamento. Esta queda da qualidade proteica foi relacionada com diminuição da disponibilidade de lisina e metionina. Mitchel e Beadle (citados por Durigan, 1978) não encontraram diminuição da disponibilidade de metionina e lisina durante o armazenamento dos feijões, no seu experimento. No entanto foi encontrada uma correlação entre o tempo de hidratação e o valor nutritivo destes feijões armazenados por estes últimos pesquisadores, indicando que a queda de valor nutri-

tivo está relacionada com características físico-mecânicas além da perda de disponibilidade de aminoácidos.

Os parâmetros tempo de cozimento e temperatura são muito importantes no aproveitamento biológico de feijões. Em muitos trabalhos citados por Durigan (1979) e pelos trabalhos de Molina et al. (1974, 1975, 1976) verifica-se que estes dos fatores são bastante afetados pelo tempo de armazenamento, temperatura e umidade relativa do local de armazenamento ocorrendo alterações no valor nutritivo do alimento.

Em condições adversas de armazenamento a qualidade da proteína pode ser alterada por diminuição da disponibilidade de alguns aminoácidos essenciais como afirmam Elias et al. (1973) e Durigan (1979).

#### 2.1.1.3 Fatores Antinutricionais

Nas leguminosas existem substâncias que podem atuar diminuindo o valor nutricional retardando o crescimento causando a morte de animais de laboratório principalmente quando são administradas cruas. Compostos com estas propriedades são chamados de fatores antinutricionais e de acordo com Bressani et al. (1973). São classificados em oito tipos: inibidor de tripsina, hemaglutinina, inibidor de amilase, glicosídeos cianogênicos, fatores gointrogênicos, fatores causadores de flatulência e favismo.

Dentre estes fatores o mais conhecido é o fator antitriptico que tem a propriedade de inibir a ação proteolítica da tripsina podendo resultar numa hipertrofia do pâncreas por excesso de produção da enzima. Os estudos com inibidores de tripsina, feitos principalmente com soja, verificaram que estes fatores são ricos em cisteína



e aminoácidos semi-essenciais. (Liener, 1976 e Bressani et al, 1973).

As leguminosas são ricas em inibidores de proteases que quando imprópriamente inativadas tornam a digestibilidade delas baixa. Estes inibidores de proteases todos são geralmente chamados de fatores anti-trípticos, mas de acordo com estudos mais recentes somente 40% da inibição de crescimento, causada pela ingestão de leguminosas mal preparadas, pode ser atribuída ao inibidor de tripsina.

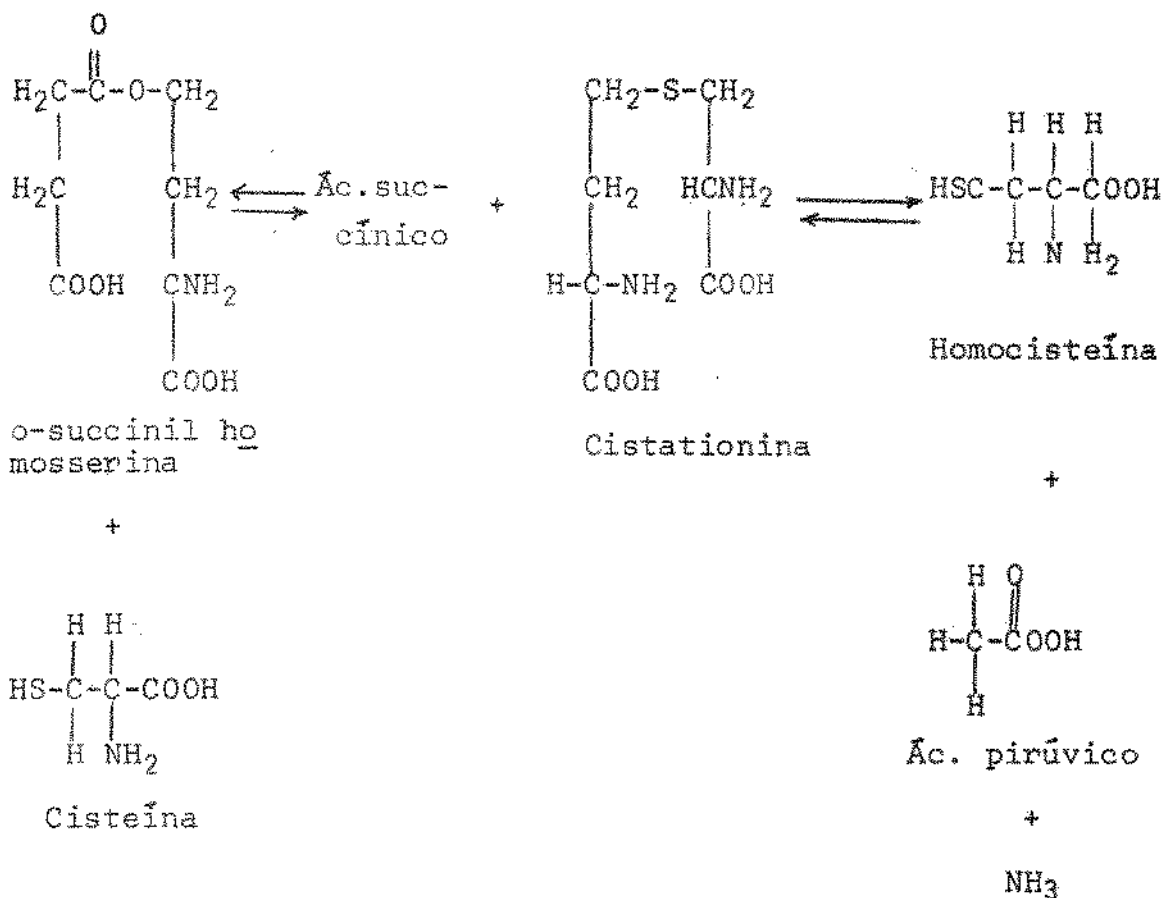
Outro fator antinutricional que vem sendo muito estudado é conhecido como hemaglutinina por ter a capacidade de aglutinar hemácias em diferentes espécies animais. Madhusudan e Kakade (1974) explicam a ação depressora do crescimento das aglutininas como sendo devida ao fato delas se ligarem as células da parede intestinal impedindo a absorção de outros nutrientes.

Todos os fatores com propriedades antinutricionais podem ser inativados por um tratamento térmico adequado. Resta então para se considerar como de importância prática no valor nutricional das leguminosas, o problema da digestibilidade e o da disponibilidade biológica de aminoácidos sulfurados. Estes dois aspectos limitantes do valor potencial das leguminosas como fonte proteica precisam ser estudados mais detalhadamente.

## 2.2. METIONINA

### 2.2.1. Importância no Metabolismo

A metionina é um aminoácido essencial para os animais, porque com o decorrer da evolução estes organismos perderam a capacidade de sintetizar as cadeias carbônicas de certos alfa-cetoácidos correspondentes aos aminoácidos que aparecem normalmente nas proteínas animais. Os microrganismos e plantas superiores podem sintetizar a metionina partindo da cisteína como fonte de enxofre e de o-succinil homosserina, em presença de succinil CoA e homosserina succinilase (White, 1976).

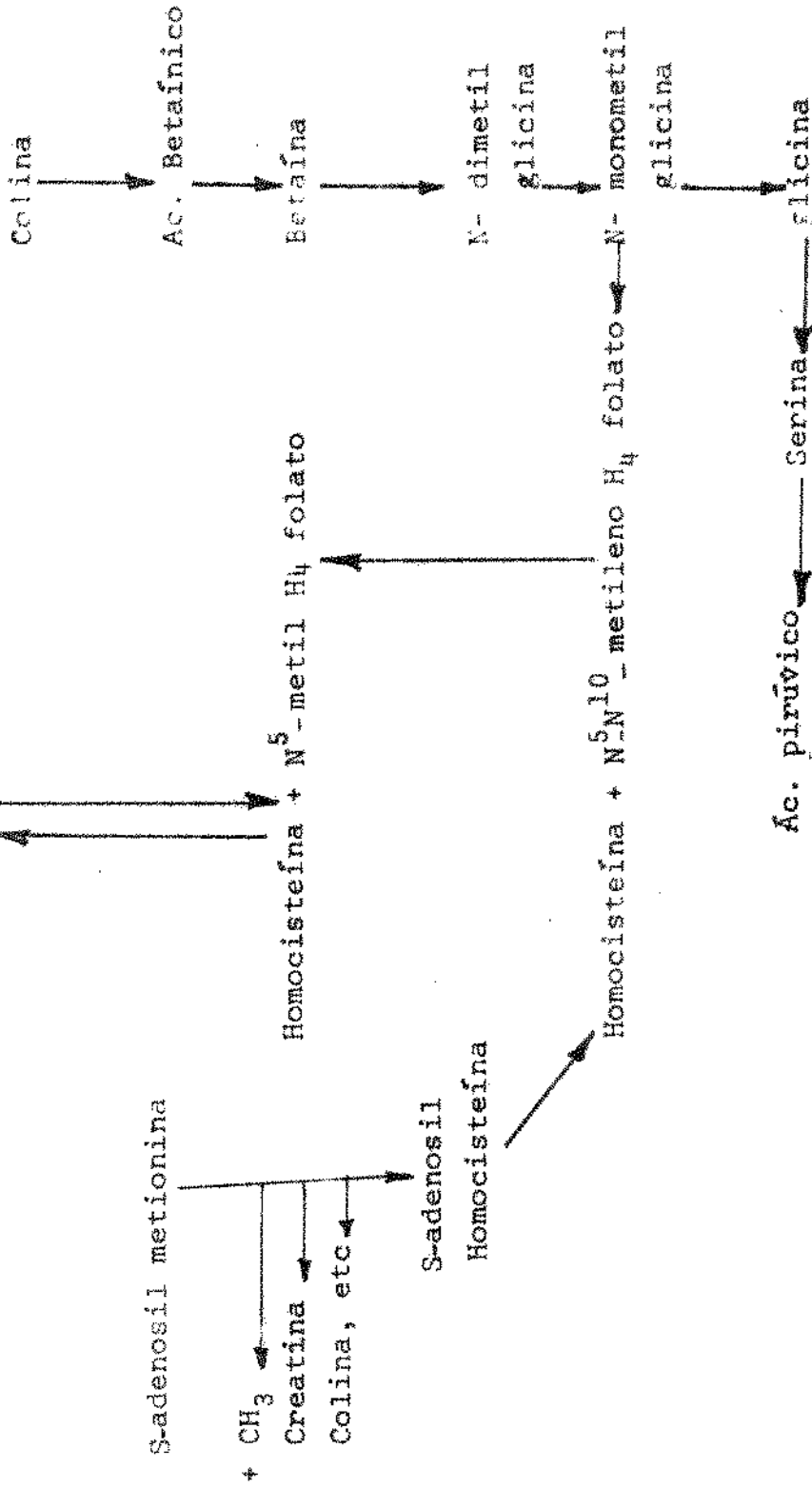


Além da sua participação na síntese das cadeias de aminoácidos para formação das proteínas, a metionina, nos organismos animais, cumpre outras funções. Também participa da estrutura e é indispensável nas funções de muitas proteínas, especialmente daquelas com propriedades catalíticas. A metionina ainda cumpre com uma série de outras funções não menos importantes: entre elas a mais significativa é a de servir como veículo ou doador de grupos metila nas reações de transmetilação. Nestas reações, a transferência do grupo metila da cadeia lateral do aminoácido para um átomo de carbono ou nitrogênio que é feita através da forma ativada S-adenosil-metionina.

A metionina, em presença de ATP passa para sua forma ativa de S-adenosil metionina que pode ceder grupamentos metila para formação de creatina e colina restando como subproduto a S-adenosil homocisteína. Após a quebra da S-adenosil homocisteína temos a adenosina que volta para suas funções e a homocisteína, que em presença do ácido N<sup>5</sup> metilfólico e a vitamina B<sub>12</sub> formará novamente metionina. Por sua vez a colina passando para sua forma oxidada (ácido betaínico) pode doar grupamentos metila.

Os três grupamentos CH<sub>3</sub> da betaína podem ser sucessivamente doados, no "pool" de metilas, até chegar a glicina. Esta por sua vez, poderá ser oxidada resultando em serina que participa do ciclo retornando a metionina em presença de homocisteína e ácido N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> metileno fólico. A serina sendo metabolizada transformar-se-a em ácido pirúvico que entra no ciclo de Krebs ou não, conforme as necessidades do organismo.

M E T I O N I N A



### 2.2.2 Reações Analíticas Características

As reações analíticas de metionina podem ser colorimétricas e titulométricas, determinando a metionina mesmo em presença de outros aminoácidos, são as seguintes, de acordo com Greenstein e Winitz (1961) e Concon (1974).

a) Desmetilação redutora baseada na determinação quantitativa dos produtos orgânicos originados da degradação de metionina em presença de ácido iodídrico. O resíduo, metiliodeto pode ser determinado por titulação.

b) Método de partição do enxofre que assume todo o enxofre na molécula de proteína proveniente de cisteína/cistina, metionina e sulfato. Procedendo uma determinação do conteúdo total de enxofre da amostra e desta quantidade subtraindo a quantidade obtida com o tratamento com ácido nítrico a metionina não é oxidada enquanto que os outros componentes sulfurados são.

c) Método iodométrico que consiste na determinação direta da metionina presente na amostra, titulando o iodo com tiosulfato, apenas baseado nos compostos formados em diferentes pHs.

d) Oxidação com peróxido de hidrogênio que consiste na determinação pela transformação de toda a metionina presente na amostra em sulfona que pode ser determinada colorimetricamente depois da separação cromatográfica.

e) Reação com nitroprussiato de sódio que em presença de metionina em meio alcalino, ao passar para um meio ácido adquire coloração vermelha.

f) Degradação com ninidrina formando aldeídos voláteis (de alanina, valina, leucina, metionina isoleucina) que podem ser transformados na respectivas dinitrofenilhidrazonas que por sua vez podem ser separados cromatograficamente.

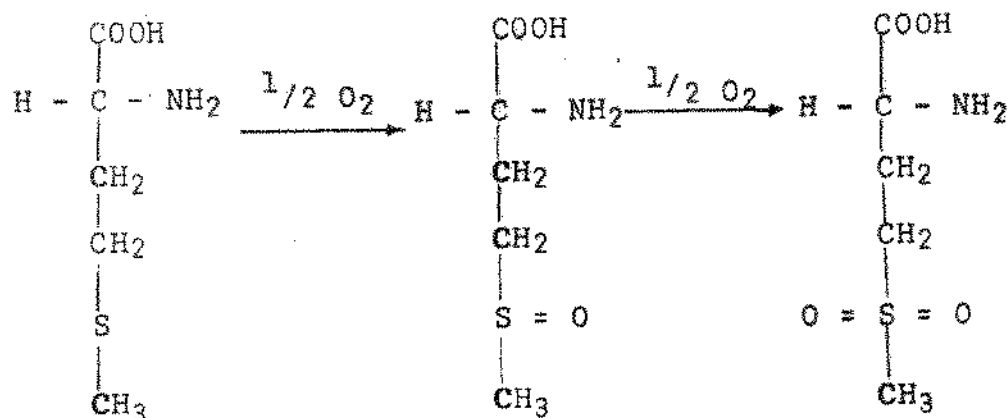
g) Detecção no cromatograma de papel baseada na formação de cor com o cloreto de diazônio alfa-naftilamina em ácido clorídrico.

h) Hidrólise e ciclização dos resíduos de metionina protéica utilizando o brometo de cianogeno. O número de resíduos formados é igual a quantidade de metionina presente na amostra, pois a reação é quantitativa (Gross, 1967).

Destas reações as mais empregadas são d, e e h.

### 2.2.3. Estados de Oxidação da Metionina e sua Utilização

As formas oxidadas da metionina são produtos da ligação de um ou dois átomos de oxigênio a ligação sulfeto resultando em sulfóxido de metionina e sulfona de metionina respectivamente (Walker et al., 1975).



Atribui-se a oxidação destes aminoácidos ao fenômeno concorrente da autooxidação lipídica que forma radicais livres os quais são poderosos agentes oxidantes (Tannenbaum, 1969; Durigan, 1979).

A utilização de água oxigenada para tratamento do leite e derivados assim como na desinfecção de equipamentos na indústria leiteira pode também causar a oxidação de aminoácidos em alguns alimentos. Acredita-se por outro lado que a tostagem e dessolventização de certos produtos de sementes podem criar condições para a oxidação (Walker et al., 1975)

As formas oxidadas são menos importante nutricionalmente, fato este que vem sendo verificado desde 1939, por Bennett (citado por Walker et al., 1975). Até recentemente porém, o valor nutritivo da forma de oxidação intermediária tem sido um tanto controverso. Njaa em 1962, sintetizou sulfóxido de metionina a partir de L,D e DL metionina e a metionina sulfona a partir da L metionina para suplementar uma dieta de farinha de soja que era administrada em ratos jovens. Como controle foram utilizadas duas dietas: uma delas, suplementada com DL metionina e a outra suplementada com glicina que funcionava como controle negativo. Através deste experimento o autor concluiu que o sulfóxido de L metionina era tão eficiente quanto a forma reduzida como fonte de enxofre para o organismo, ao passo que os sulfóxidos de DL e D metionina eram respectivamente 25 e 50% menos eficientes. Já a metionina sulfona não era utilizada pelo animal. Entre os diferentes isômeros de metionina não havia diferença de utilização. Isto veio confirmar a hipótese que a utilização da metionina pelo organismo está relacionada com seu estado de oxidação. Trabalhos de Miller e Samuel (1968) e Ellinger e Palmer (1969) vieram confirmar estes resultados (citados por Walker et al., 1975).

Apesar de vários autores terem reportado resultados conflitantes no que diz respeito a utilização do sulfóxido comparado com a metionina, todos concordaram porém que a sulfona de metionina não é aproveitada pelo organismo.

Um trabalho feito em 1977 por Gjoen e Njaa, parece poder ex-

plicar os resultados conflitantes sobre o aproveitamento do sulfóxido. Estes autores encontraram que o sulfóxido de metionina, era pobremente utilizado quando a cisteína não estava na mistura de aminoácidos, sendo que os trabalhos anteriores não levam em conta a quantidade de cisteína presente na amostra. A melhor utilização do sulfóxido em presença de cisteína era devida a mais rápida redução da forma parcialmente oxidada a metionina atuando assim da mesma maneira que se a metionina estivesse já reduzida.

#### 2.2.4. Disponibilidade de Metionina

Metionina nutricionalmente disponível é a fração da metionina total que pode ser aproveitada pelo organismo. Nem sempre a totalidade de um aminoácido pode ser biologicamente utilizável devido a pelo menos três razões (Lipton e Bodwell - 1975):

- a) Localização do resíduo em regiões da proteína resistentes a hidrólise
- b) Oxidação da cadeia lateral do aminoácido.
- c) Alquilação do grupo tiometila.

Uma vez que, o valor biológico ou nutricional de uma proteína depende não só da quantidade total de um aminoácido essencial limitante mas também da disponibilidade dele, existe um interesse especial na avaliação das proteínas sob o ponto de vista da disponibilidade dos aminoácidos essenciais. (Walker et al., 1975).

Um fator que determina a disponibilidade dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína, segundo Pieniazek et al. (1975), é a frequência com que os mesmos se encontram em peptídeos resistentes



a ação de enzimas proteolíticas, quando o alimento em que se encontram é tratado termicamente. Trabalhando com caseína aquecida por 24 horas a 90°C estes pesquisadores encontraram diferenças no conteúdo total e disponível de metionina e cisteína.

Para comparar as composições de aminoácidos de caseína tratada e não tratada termicamente, estes autores, usaram um sistema enzimático constituído de pancreatinopeptidase E, leucinoaminopeptidase que permitem a liberação de aminoácidos in vitro. Os resultados dos experimentos feitos com este sistema hidrolítico sugeriram que na caseína tratada termicamente havia formação de peptídeos resistentes a hidrólise. O estudo de comportamentos das caseínas oxidada e não oxidada diante deste sistema enzimático e de experimentos feitos in vivo mostraram uma diminuição da disponibilidade de metionina e cisteína.

A diminuição da disponibilidade de aminoácidos na caseína oxidada não está somente relacionada com a destruição de uns aminoácidos como tirosina e triptofano e oxidação de aminoácidos sulfurados, tornando-se indisponíveis, mas também a formação de peptídeos resistentes a ação de enzimas proteolíticas. Apesar da maior extensão de peptídeos não hidrolisáveis presentes na caseína tratada termicamente não se pode afirmar que a diminuição da disponibilidade de aminoácidos esteja somente relacionada com a presença de ácido cisteico na cadeia de peptídeos.

Num trabalho anterior a estes, Miller et al. (1965) encontraram em filés de pescado que a metionina disponível microbiologicamente mostrava maior diminuição quando aquecida a 50% de umidade que a 14% de umidade e que a diminuição era mais intensa com este tratamento que quando aquecida com glicose a 85°C.

A explicação dada por Mechan e Olcott (citados por Miller et al., 1965), para a diminuição da disponibilidade da metionina é

a formação de "cross linking" entre a cadeia lateral de um aminoácido e outro, tanto intra como intermolecularmente. Isto é devido a uma condensação entre aminoácidos com grupos hidroxilas e os grupos carboxilas de outros aminoácidos. De acordo com esta explicação os mesmo autores observaram aumentos de pH de materiais aquecidos como se esperava quando se formam ligações de esteres. Já na presença da glicose embora os linkages apareçam, o pH não aumenta do mesmo modo.

Na mesma série de trabalhos de Miller et al. (1965), estudando a disponibilidade de aminoácidos sulfurados em filês de bacalhau tratados pelo calor, encontraram que a disponibilidade de metionina para frangos diminuía, mas o conteúdo total, determinado por ácido perfórmico e cromatografia de troca iônica, permanecia o mesmo.

Nas proteínas vegetais o problema da disponibilidade de aminoácidos sulfurados pode ser agravado pela presença de inibidores enzimáticos, Beláitz et al, (1972) isolaram inibidores de proteínase de Phaseolus vulgaris (variedade nanus) e compararam inibidores isolados de Phaseolus coccineus e Phaseolus lunatus. Os resultados encontrados mostraram que as proteínas envolvidas na inibição da ação proteolítica são semelhantes nas diferentes espécies.

Oledska et al. (1973) compararam a "facilidade" de digestão enzimática entre ervilhas, fava e diferentes espécies de feijão verde utilizando digestão in vitro. Nas três espécies de sementes foram encontrados inibidores de tripsina, quando elas estavam cruas. A soja, entre os materiais estudados apresentou maior capacidade inibir tripsina.

Bressani et al. (1975) atribuem a baixa digestibilidade das proteínas de leguminosas a quatro fatores: inibidores de tripsina, condições de processamento, estrutura das proteínas e presença de

substâncias tais como, o fenol que por se complexar com a proteína torna-a indisponível.

Isolando as proteínas de reserva do feijão, Romero e Ryan (1978) verificaram a presença de peptídeos grandes que resistiam a ação da tripsina, mas tratando termicamente a proteína isolada a resistência a ação de tripsina era diminuída devido a alteração da conformação nativa.

Em 1978, Evans apresentou um estudo em que se propunha a determinar a causa da baixa utilização da cistina e metionina de feijões secos, fazendo ensaios biológicos com ratos. Embora não tenham sido atingidos os objetivos iniciais do trabalho ele tem o mérito de apresentar algumas importantes considerações que podem servir como indicação sobre a indisponibilidade de aminoácidos sulfurados. Deste trabalho as principais conclusões que se pode chegar são:

a) Ratos em crescimento alimentados com feijão autoclavado não absorviam 50% da metionina e 41% da cisteína do feijão.

b) Quando a farinha do feijão era suplementada com a metionina sintética, a metionina adicionada era completamente absorvida.

c) Os ftatos aparecem nos feijões e podem se complexar com proteínas tornando-as indisponíveis para o aproveitamento humano. No entanto, apesar desta certeza o trabalho não permitiu nenhuma conclusão baseada em dados experimentais, pois os animais utilizados no teste, para a dieta controle, não cresceram normalmente.

Durigan (1979) no seu trabalho, onde estudou a influência das condições e do tempo de armazenamento no valor nutritivo de feijão afirmou que o prejuízo do valor nutritivo desta semente era devido a diminuição da metionina disponível e apontou os peróxidos que se

desenvolveram durante a estocagem como uma das possíveis causas da perda. Não houve mudança detectável na digestibilidade do feijão com o tempo ou condições de armazenamento, não se podendo afirmar que a queda do valor nutritivo fosse devida a perda da digestibilidade, se bem que alguns autores como Mitchell e Beadle (1949) e Pomeranz (1974) afirmam isto. Neste trabalho encontrou-se uma correlação entre a perda de cozinhabilidade e a diminuição do valor nutricional, como também afirma Burr (citado por Durigan, 1979).

Apesar que Walker et al. (1975) e Tannenbaum et al. (1969) tenham se referido aos peróxidos como agentes capazes de oxidar os átomos de enxofre da cadeia lateral de aminoácidos sulfurados tornando-os inaproveitáveis biologicamente, tem-se que admitir a existência de alguma relação ou interação muito especial entre proteínas e lipídeos presentes em feijões, que merece ser estudada. Pois os lipídeos em geral, se encontram aparentemente em quantidade muito baixa para levar a uma perda relativamente grande de disponibilidade de aminoácidos.

#### 2.2.5. Problemas na Determinação de Metionina

Considerando-se que só a metionina e o sulfóxido de metionina tem valor nutritivo, ainda que o sulfóxido não seja tão eficiente quanto a forma reduzida, pode-se dizer que a metionina disponível num alimento seria a soma destas duas formas. É de interesse para técnicos e cientistas que se aperfeiçoem métodos químicos simples para determinação da disponibilidade de metionina, porque os métodos biológicos que vem sendo empregados neste sentido também não fornecem resultados diretamente extrapoláveis ao sistema humano e podem ser dispendiosos.

A determinação de metionina total de um alimento é uma tare-

fa relativamente simples. Basta tratar a amostra com ácido perfórmico para garantir que 100% do aminoácido passe para a forma de sulfona. Determinar a proporção em que os três estados de oxidação se encontram na amostra original, porém é um trabalho até hoje difícil devido a instabilidade do sulfóxido, que pode ser completamente oxidado ou voltar a forma reduzida, a metionina. Além disso, quantidades variáveis de produtos metilados, homocisteína e ácido homocisteico podem aparecer depois de uma hidrólise ácida comum (Walker et al, 1975).

A análise por espectroscopia fotoeletrônica de raio X ou espectroscopia eletrônica para análise química pode distinguir os diferentes estados de oxidação do átomo de enxofre, mas apesar destas metodologias serem relativamente simples, a instrumentação é altamente sofisticada e de difícil acesso a maioria dos pesquisadores e técnicos.

Um reagente para determinação da metionina disponível deve distinguir o estado de oxidação do átomo de enxofre da cadeia lateral de metionina, devendo ainda não ser barrado por possíveis impedimentos estéricos do aminoácido.

## 2.3. MÉTODOS PROPOSTOS PARA A DETERMINAÇÃO DE METIONINA

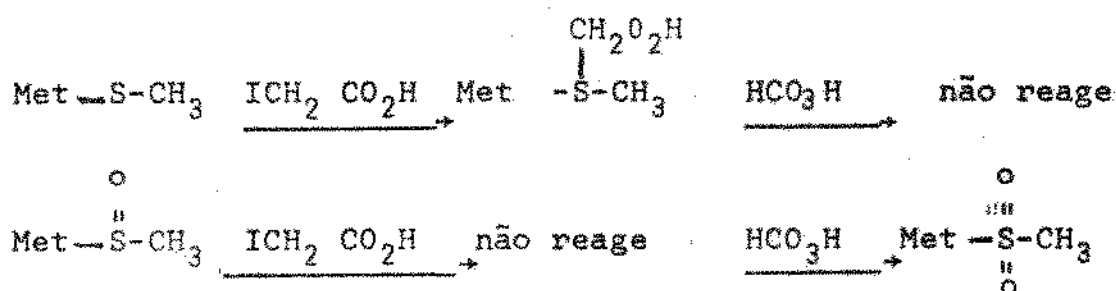
### 2.3.1. Métodos Químicos

Várias são as reações específicas para o grupo tiometila propostas até hoje para determinar seletivamente os produtos de oxidação ou alquilação da metionina. A aplicação destas reações foram revistas em detalhe por Walker et al. (1975).

Neumann (1967) aproveitou o fato de que o sulfóxido de metio

nina é estável em pH elevado para fazer uma hidrólise especial em meio alcalino e determinar a fração de sulfóxido por cromatografia de troca iônica. Este método não teve sucesso devido a interferência que surgia durante a determinação do sulfóxido por cromatografia. A interferência consistia na superposição da pequena banda do sulfóxido com a banda normal do ácido aspártico.

Como alternativa o mesmo autor propôs a determinação indireta do sulfóxido. Isto é possível medindo as quantidades de sulfona, formadas durante a oxidação que deveria ser feita antes e depois de uma reação de alquilação da metionina intacta. O procedimento baseia-se no fato de que o ácido iodoacético reage com a metionina reduzida originando um derivado alquilado, o que não acontece com o sulfóxido de metionina, como indica a reação abaixo:

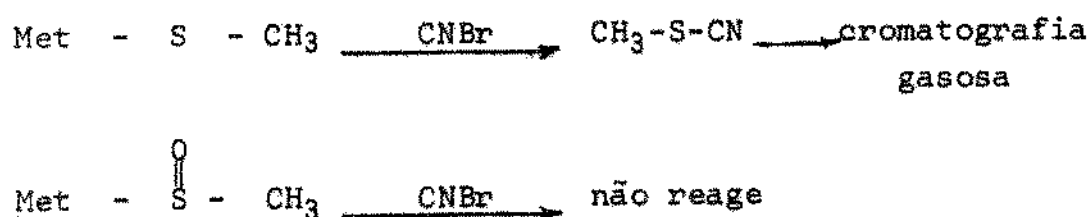


A amostra após o tratamento com ácido iodoacético, é submetida a oxidação com ácido perfômico. Nesta etapa só o sulfóxido será oxidado a sulfona, que após hidrólise com ácido clorídrico 6 N pode ser determinado por cromatografia de troca iônica. Dois problemas podem se apresentar neste tipo de análise:

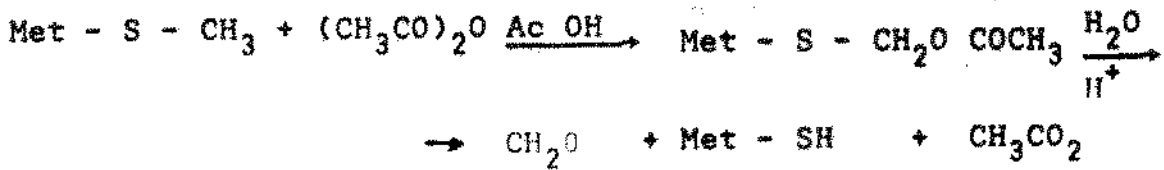
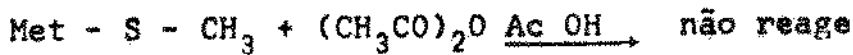
1º) Que o erro no resultado pode ser considerável caso haja uma quantidade significativa de sulfona proteica.

2º) A metionina reduzida pode não ser completamente alquilada por estar impedida estericamente.

Ellinger e Smith (1971) propuseram também um método indireto para a determinação do sulfóxido de metionina utilizando o reagente brometo de cianogeno e determinando a metionina total presente com ácido perfórmico. A reação da metionina com o brometo de cianogeno produz quantidades estequiométricas de tiocianeto de metila que sendo volátil, pode ser determinado por cromatografia gasosa. Da diferença entre a metionina total, determinada por oxidação e a determinada pelo procedimento descrito tem-se a estimativa do sulfóxido presente. O inconveniente neste caso é novamente que não seria possível distinguir entre o sulfóxido e a sulfona de metionina, sendo portanto difícil determinar a metionina disponível.

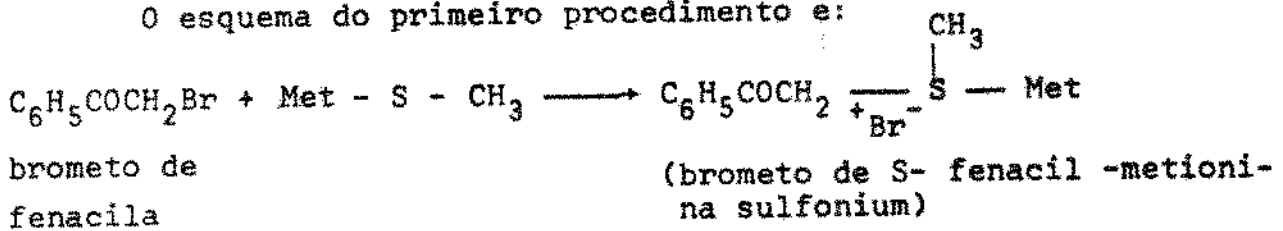


Baseado no fato de que o anidro acético em meio ácido acético reage com o sulfóxido de metionina, Lunder (1972) propôs um método direto para determinar o sulfóxido na proteína. Durante esta reação toda a metionina que estiver na forma reduzida permanece intacta, enquanto que o sulfóxido de metionina vai reagir com o anídrico acético resultando num derivado sulfeto de acetoximetila. Após a hidrólise ácida o formolaldeído liberado pelo derivado é removido por arraste a vapor e assim a metionina reduzida pode ser calculada quando se conhece o valor de metionina total. As desvantagens principais deste método são: o fato de se precisar de uma quantidade relativamente grande de amostra, não é possível diferenciar entre o sulfóxido de metionina e a sulfona de metionina.

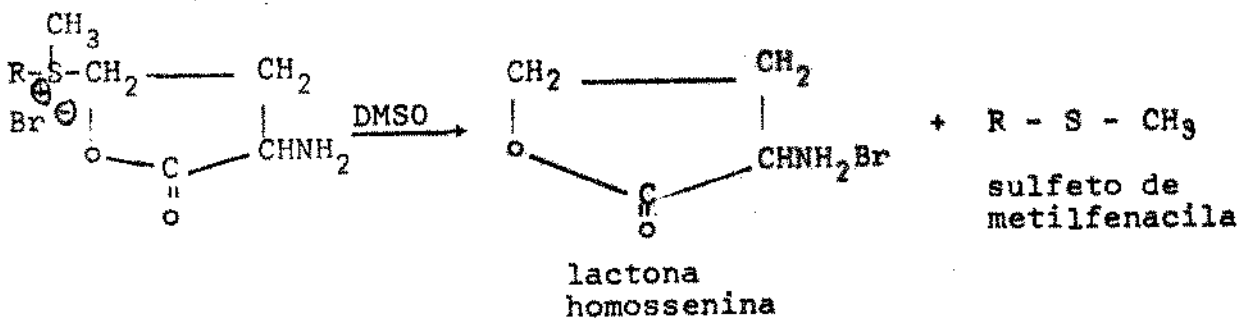


Lipton e Bodwell (1975, 1976, 1977) vem estudando dois métodos químicos para determinação de metionina nutricionalmente disponível utilizando o reagente dimetilsulfóxido. Em ambos os casos a determinação não exige hidrólise ácida e no segundo procedimento é muito simples sugerindo maiores perspectivas para sua utilização.

O esquema do primeiro procedimento é:



Clivagem do SPM por DMSO



Trata-se então, de alquilar a metionina com brometo de fenacila e clivar o derivado com dimetilsulfóxido. O sulfeto de alquil





ferricianeto de sódio desenvolvia coloração vermelha. Na proteína nativa, o ácido utilizado para a reação colorimétrica desnaturava e precipitava a proteína, impedindo a leitura no colorímetro. Para solucionar o problema utilizaram uma hidrólise ácida prévia da proteína que também servia para eliminar o triptofano que interferia ligeiramente na reação colorida. Alguma interferência provocada também pela histidina era eliminada mediante alcalinização do meio e adição de glicina.

McCarthy e Sullivan trabalharam com caseína e não encontraram muitas dificuldades para obtenção de um hidrolisado límpido, mas outros autores trabalhando com outros substratos tiveram problemas de escurecimento. Lunder (1973) propôs uma modificação do método original retirando as impurezas do hidrolisado com carvão ativo e lavagem deste com álcool etílico para recuperar a metionina. Por esta razão McCarthy e Paille (1969) modificaram a metodologia empregando a hidrólise alcalina.

Também para evitar a destruição ácida da metionina Horn et al. (1964) introduziram a hidrólise com papaína. Posteriormente este tipo de hidrólise veio ser bastante utilizado por muitos autores como Palwik (1973), Gherké e Neumer (1974) e Moreira et al. (1976).

O conteúdo de metionina e cisteína disponível em vários alimentos foi determinado por Pieniazek (1975). Usando hidrólise enzimática os resultados obtidos para metionina disponível com método químico eram confirmados por ensaios biológicos feitos com ratos em crescimento.

Tannenbaum et al. (1969) determinaram metionina disponível em caseína oxidada utilizando uma hidrólise enzimática com pronase de S. griseus, seguida por reação colorimétrica de McCarthy e Sullivan mo-

dificada. A reação permitia distinguir entre a forma de metionina e sulfóxido de metionina mas contava com o problema da baixa sensibilidade do nitroprussiato de sódio para amostras com pequenas quantidades de metionina.

Em proteínas com alto teor de metionina, como clara de ovo, caseinato de sódio, caseína e preparados com proteína de soja, foram bons os resultados obtidos por Tederko (1972), modificando o método de Mc Carthy e Sullivan.

São vários autores que descrevem métodos para determinação de metionina total, utilizando fundamentalmente o ácido perfórmico, como agente oxidante, e separação cromatográfica por troca iônica. As modificações descritas são adaptações necessárias devido ao tipo de amostra. Entre os autores podemos citar Kremen e Vaughn (1967), que trabalharam com feijão mungo, Herrick et al. (1972), que determinaram metionina em ervilha, feijão e lentilha e temos ainda Jamalian e Pellet (1968) que determinaram metionina total em vários alimentos típicos do Oriente Médio.

A espectroscopia fotoeletrônica de raios-X ou espectroscopia eletrônica para análise química pode distinguir entre as diferentes formas de oxidação do átomo de enxofre. Mas, embora os princípios destes métodos sejam bastante simples, a instrumentação é sofisticada.

### 2.3.2. Métodos Biológicos

Ensaio biológico para avaliar a disponibilidade de metionina têm sido descritos utilizando ratos e frangos. Nestes casos, os parâmetros são peso ganho, água corporal, proteína consumida, ração consumida pelos animais e estes parâmetros são utiliza

dos para cálculos de NPU, PER e eficiência de conversão do alimento (FCE) ou retenção de nitrogênio.

Miller et al. (1965) estudaram uma metodologia onde frangos eram utilizados na avaliação da disponibilidade de metionina em várias fontes proteicas. Utilizaram como dieta basal farinha de soja e farinha de amendoim, experimentando em ambas as dietas basais diferentes níveis de metionina e cisteína adicionadas. Para avaliação de metionina em seis concentrados proteicos de origem animal empregaram a farinha de amendoim. Os resultados de todas as dietas administradas a frangos foram comparados com resultados de avaliação de metionina disponível utilizando microorganismos (Streptococcus zymogenes). A correlação entre os dois tipos de avaliação tinha  $r = 0.93$  quando as dietas, antes de serem avaliadas por microorganismos, eram submetidas a tratamento prévio com papaína.

Num outro trabalho desta série destes autores submeteram músculo de bacalhau congelado a dezesseis diferentes condições de tratamento térmico, com a umidade variando de 1 a 50% e a temperatura de 45 a 116°C, alguns tratamentos tiveram 10% de glicose adicionada. Para avaliação da disponibilidade de metionina e leucina fizeram ensaios microbiológicos utilizando Streptococcus zymogenes e para digestibilidade foram utilizados ensaios com ratos. Os ensaios microbiológicos podiam medir de maneira satisfatória os danos causados pelo tratamento térmico em aminoácidos sulfurados.

Njike et al. (1975), numa série de três trabalhos descreveram também um ensaio biológico com frangos mais preciso que os anteriormente mencionados. Inicialmente foi necessário estabelecer uma dieta basal para estes experimentos, e em seguida, as potências relativas de diversos concentrados proteicos de origem animal foram determinados pela medida do ganho de peso, eficiência de conversão do alimento (FCE) e retenção de nitrogênio.

Não se apresentaram diferenças significativas entre as médias obtidas de qualquer das medidas tomadas como indicativas da disponibilidade. Os mesmos bioensaios efetuados com concentrados proteicos de plantas indicaram a inferioridade das proteínas vegetais, quando comparadas com as proteínas animais. Esta inferioridade não podia ser justificada em termos de indisponibilidade de metionina mas do conteúdo inadequado de metionina total nas amostras vegetais.

Para métodos microbiológicos, os microorganismos mais utilizados para determinação de disponibilidade de aminoácidos sulfurados são: Leuconostoc mesenteroides e o Streptococcus zymogenes mutantes estes que não sintetizam sua própria metionina, além de outro aminoácidos.

De uma maneira geral o procedimento para métodos microbiológicos consiste de uma hidrólise enzimática parcial, para facilitar o aproveitamento por 48 horas a 37° C com quantidades medidas deste hidrolisado incorporadas num meio sintético, que contém todos os nutrientes necessários para o crescimento da bactéria, exceto o nutriente que se está estudando. Por turbidimetria mede-se o crescimento da bactéria e a quantidade do aminoácido disponível é avaliada comparando com uma curva padrão feita com quantidades conhecidas do aminoácido (Miller et al. 1965). Quando ao invés da hidrólise enzimática se utiliza a hidrólise ácida, pode-se determinar a quantidade mais próxima do conteúdo total de aminoácidos do alimento já que o fator digestibilidade não intervem. Fica portanto a pergunta: a hidrólise com enzimas vegetais ou fungicas "in vitro" representam adequadamente o processo no sistema digestivo do homem ?

Hannah et al. (1977) utilizaram pronase para determinar aminoácidos sulfurados disponíveis em Vigna unguiculata e Phaseo-

lus vulgaris, mas não temos informação quanto a correlação entre estes resultados e qualquer avaliação feita com animais superiores.

Também Evans et al. (1976) usaram o Streptococcus zymogenes para determinar a disponibilidade de metionina em farinhas preparadas com cinco leguminosas, encontrando diferenças não significativas entre o emprego de pronase na hidrólise prévia ao ensaio microbiológico e o processo de hidrólise ácida, seguida da reação colorimétrica de Mc Carthy e Sullivan.

É interessante ressaltar o fato de que no trabalho de Miller et al. (1965), obtiveram boa correlação ( $r = 0.93$ ) entre a avaliação feita com substratos submetidos a ação enzimática e avaliação microbiológica posterior e os testes destes mesmos substratos feitos por avaliação biológica. Tem-se considerar o fato de que estes substratos não foram submetidos a tratamento térmico e nestes casos as diferenças de utilização de uma proteína por organismos diferentes se fazem mais marcantes.

Resumindo esta revisão pode-se afirmar:

19) A maioria dos métodos químicos empregados para avaliação do estado de oxidação do átomo de enxofre da metionina não são capazes de distinguir entre o sulfóxido e a sulfona.

29) Que o método de Mc Carthy e Sullivan baseado numa reação clássica tem condições para ser usado na dosagem conjunta de metionina e sulfóxido de metionina, embora esta possibilidade nunca tenha sido bem estudada.

39) Embora pareça não existir diferença entre os sistemas de hidrólise prévia para os ensaios microbiológicos, sempre restam dúvidas. No caso dos métodos microbiológicos, são necessárias relativamente grandes quantidades de proteína para avaliação da dis-

ponibilidade de aminoácidos.

49) É importante desenvolver ou poder contar com alternativas químicas que, através da dosagem de metionina quimicamente disponível, pudessem dar uma medida da disponibilidade biológica de um aminoácido essencial, como a metionina. Deve ser levado em consideração que os métodos biológicos também não podem fornecer resultados absolutos já que o aproveitamento de um aminoácido por organismos diferentes não é necessariamente o mesmo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRAS

Para este trabalho doze variedades de feijão Phaseolus-vulgaris, L) foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas. As variedades pertenciam a safra de fevereiro de 1978 e eram as seguintes: Aeté I, Aeté II, Aroana, Bico de Ouro, Cara Suja, Carioca, Goiano Precoce, Piratã I, Piratã II, Rosinha G<sub>2</sub>, SC7010, SP7052. De cada variedade foram formados quatro lotes, um para ser submetido a análise imediatamente e os outros para serem armazenados.

##### 3.1.1. Preparação de Amostras

O procedimento para preparação das amostras, que seriam submetidas a análise química foi o mesmo em todos os lotes de feijão formados, tanto para os lotes que foram como para os que não foram armazenados.

Os grãos de feijão passavam primeiramente por um moinho de martelo para serem quebrados. Nesta etapa procurou-se evitar o aquecimento para minimizar as possíveis perdas de substâncias termos sensíveis. Os farelos da primeira quebra foram posteriormente reduzidos em um moinho Braun até passarem por uma peneira de 100 mesh. Um resíduo tegumentoso que ficou na peneira, representando aproximadamente 2 a 3% do peso total dos grãos submetidos a moagem, que foi desprezado. O material resultante (farinha de 100 mesh)



foi embalado em frascos plásticos guardados em refrigerador.

### 3.1.2. Armazenamento de Amostras

Aproximadamente 40 g de cada variedade de feijão foram armazenadas por oito meses, distribuídas em três cubas, com frascos de vidro, de modo que cada cuba contivesse as doze variedades. No interior das cubas foi colocada uma solução saturada de sulfato de amônio que permitia uma umidade relativa constante de 80% na faixa de temperatura de 20 - 30° C. (Hall, 1957). Esta solução foi renovada cada duas semanas com a finalidade de garantir uma umidade relativa constante.

Durante os oito meses de armazenamento num ambiente onde a temperatura variou entre 20 e 26° C. Os intervalos de tempos que os lotes foram retirados do armazenamento para análise foram: 60, 150 e 240 dias.

### 3.1.3. Caracterização Bromatológica das Amostras

#### 3.1.3.1. Umidade

A porcentagem de umidade de todas as amostras foi determinada em estufa a 110° C até que a farinha tivesse peso constante, conforme a metodologia descrita pela AOAC (1970).

#### 3.1.3.2. Proteína

A metodologia empregada foi exatamente a proposta pela

AOAC (1970) para determinação de nitrogênio pelo método de Kejh dahl. A porcentagem de proteína de cada variedade foi obtida multiplicando a porcentagem de nitrogênio pelo fator 6.25.

### 3.1.3.3. Composição de Aminoácidos.

Para determinação da composição de aminoácidos de uma amostra, utilizando o analisador automático de aminoácidos, é necessária uma hidrólise com ácido clorídrico 6 N. Para que esta hidrólise seja satisfatória deve existir uma relação adequada de proteína e volume de ácido empregado, que deverá estar ao redor de 1 mg de proteína por ml de ácido.

No caso do presente trabalho, 100 mg de farinha de cada variedade foram hidrolisadas em tubos selados preenchidos até a borda com ácido clorídrico 6 N, dando um volume final de aproximadamente 25 ml. Esta quantidade de amostra e este volume de ácido estavam dentro da relação tida como adequada pois a porcentagem média de proteína por amostra estava em torno de 27 a 28%.

Após 22 horas de hidrólise em estufa a 110° C o hidrolisado foi filtrado a vácuo em funil de vidro poroso fino e o volume completado para 50 ml com água destilada. Deste volume tomou-se uma alíquota de 10 ml para ser evaporada em rotavapor, fazendo após a primeira evaporação três lavagem sucessivas com 15 ml de água destilada para retirar o excesso de ácido. O evaporado foi dissolvido em tampão citrato em pH 2.2 de modo que ao final da diluição ficasse 1 mg de proteína por ml de tampão. Para determinação dos aminoácidos 0.2 ml de amostra foram injetados no analisador de aminoácidos modelo Beckman 120 C.

## 3.2. DETERMINAÇÃO DA METIONINA

### 3.2.1. Estudo dos Parâmetros que Influem na Hidrólise

#### 3.2.1.a. Escolha da Enzima

Foram testadas três enzimas proteolíticas para encontrar qual a que serviria melhor para os objetivos do trabalho, ou seja a exposição de resíduos de metionina para complexação com nitroprussiato de sódio. Dentre estas enzimas duas eram inespecíficas, a protease de Bacillus subtilis e a do Streptomyces griseus e uma enzima específica, a papaína, também foi testada.

Para as duas primeiras proteases foi seguido o procedimento de hidrólise descrito por Spies (1967) para determinação de triptofano, modificando a concentração da solução enzimática, de 1% para 0.2% de enzima em tampão fosfato pH 7.5. Após 24 horas em banho-maria a 40°C o hidrolisado, que continha 200mg de feijão Rosinha G2 em 5ml de solução enzimática foi filtrado e 1 ml deste hidrolisado foi submetido a precipitação com ácido clorídrico concentrado. Neste teste maior turbidez indica menor ação da enzima.

A pepsina teve sua atividade testada pelo procedimento de Akeson e Stahmann (1967) que consistia em hidrolisar 500mg de proteína de feijão Rosinha G2 com 12.5mg de pepsina em 15ml de ácido clorídrico por 3 horas em banho-maria a 37°C. O teste de precipitação com ácido clorídrico concentrado também foi efetuado aqui.

#### 3.2.1.1. Determinação da Atividade Enzimática

Pelo teste anterior foi escolhida a protease do Streptomyces griseus da qual foi determinada a atividade através de dois testes: precipitação com TCA e reação colorimétrica de McCarthy e Sullivan, modificada por Tannenbaun (1969).

A solução enzimática para os dois testes foi: 100 mg de protease de Streptomyces griseus dissolvido em 50 ml de tampão fosfato pH 7.5. Após 15 minutos a solução foi centrifugada a 15.000 r.p.m. por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para a hidrólise.

#### 3.2.1.1.1. Precipitação com TCA

Duas séries de tubo, cada um contendo 100 e 200 mg de caseína e 5 ml de solução, foram incubadas em banho-maria a 40° C. Durante a primeira hora de incubação retirava-se um tubo de cada série em intervalos de vinte minutos depois da primeira hora de incubação, os intervalos de retirada passaram-se a não ser de sessenta minutos até se completassem três horas de incubação. De todos estes hidrolisados tomaram-se 1 ml para ser precipitado com 5 ml de solução de TCA 5 %. Agitou-se esta mistura esporadicamente por 40 minutos após os quais filtrou-se a mistura em papel de filtro, efetuando-se a leitura da absorbância do filtrado em espectrofotômetro a 280 nm. Quando a leitura da absorbância do filtrado ficou constante considerou-se que a reação estava virtualmente completa.

#### 3.2.1.1.2. Reação Colorimétrica de McCarthy e Sullivan

Para este teste 200 mg de caseína, milho (variedade normal verde) e de feijão Rosinha G<sub>2</sub> foram incubados com 5 ml de solu

enzimática por 24 horas em banho-maria a 40° C. Os hidrolisados foram filtrados em papel de filtro e submetidos a precipitação com ácido clorídrico concentrado e a reação colorimétrica de McCarthy e Sullivan, modificada por Tannenbaum (1969).

### 3.2.1.3. Estudo do Cociente Enzima Substrato

Devido ao fato da adição de ácido provocar a precipitação do hidrolisado de feijão pensou-se que a relação enzima substrato não estivesse adequada para este substrato. Para otimizar este parâmetro soluções enzimáticas de protease de S. griseus foram preparadas de modo que cada 5 ml de solução correspondesse a 5, 10, 15 e 20 mg de protease, respectivamente.

De cada uma destas soluções 5 ml foram incubados com 200 mg de farinha de feijão Rosinha G<sub>2</sub> em banho-maria a 40°C por 24 horas, sendo cada filtrado destes hidrolisados submetidos a precipitação com ácido clorídrico concentrado e a reação colorimétrica pelo procedimento de Tannenbaum (1969).

### 3.2.1.4. Estudo do Efeito do Modo de Adição da Enzima

A enzima protease de Streptomyces griseus, para ser empregada na hidrólise foi preparada como já se indicou na seção 3.2.1.1.

A 200mg de amostra de feijão (Rosinha G<sub>2</sub>) adicionava-se 2ml da solução enzimática no início da incubação. Decorridas duas horas adicionava-se mais 2ml e finalmente, após 4 horas, completava-se o volume para 5ml, deixando hidrolisar por 4 e 8 horas

em cada caso.

Noutros parcelamentos eram adicionados 2, 2 e 1 ml em tempos de 0, 4 e 8 horas respectivamente, para um tempo total de 24 horas. Também adições de 2.5 ml inicialmente e 2.5 ml após 4 e 8 horas deixando 8 e 24 horas respectivamente antes da reação de precipitação e colorimétrica. Como controle tomava-se um tubo onde 5 ml de solução enzimática foi incubada por 24 horas, como em todos os casos anteriores a 40°. A Tabela 2 mostra o parcelamento detalhadamente.

TABELA 2: Parcelamento do modo de adição da enzima

TUBOS	Acrêscimos de enzima em solução (ml)	Tempo do acréscimo em horas	Tempo total de hidrólise em horas
1	2	0	4
	2	2	
	1	4	
2	2	0	8
	2	2	
	1	4	
3	2.5	0	8
	2.5	4	
4	2	0	24
	2	4	
	1	8	
5	2.5	0	24
	2.5	8	
6	5	0	24

### 3.1.2.5. Estudo do Tempo da Hidrólise

Cada 200 mg de farinha de feijão G<sub>2</sub> com 5 ml de solução enzimática, preparada como foi descrita no ítem anterior deixadas a 40° C por 1, 2, 4, 6, 8, 18 e 24 horas. Retirados do banho, os hidrolisados resfriados, foram filtrados em papel de filtro e submetidos a testes de precipitação e colorimétrico como nos testes anteriores.

### 3.2.2. Testes para Eliminar ou Diminuir a Interferência dos Inibidores da Proteólise

No início todos os procedimentos descritos não foram bem sucedidos porque sempre ocorria a precipitação do hidrolisado com adição de ácido, o que indicava a presença de peptídeos grandes ou mesmo proteínas no hidrolisado. Resolveu-se então tentar eliminar os efeitos dos inibidores, que se sabe presentes em feijões, através de dois procedimentos: desnaturação térmica e tratamento ácido brando prévio.

#### 3.2.2.1. Desnaturação Térmica.

Amostras de 10 g de feijão G<sub>2</sub> foram cozidos em panela aberta, por trinta minutos, com uma quantidade de água que correspondia a um teor de aproximadamente 90% de umidade, cuidando de não deixar evaporar toda água e mantendo a umidade o mais constante possível. Em seguida, a amostra foi congelada a -40° C e liofilizada. Na farinha obtida do liofilizado efetuaram-se, após hidrólise pelo procedimento habitual, os testes de precipitação

com ácido clorídrico e reação colorimétrica, segundo Tannenbaum (1969).

#### 3.2.2.2. Tratamento Prévio com Ácido

Tomava-se 1.2 g de amostra (farinha de feijão Rosinha G<sub>2</sub>) e 20 ml de ácido clorídrico 1 N deixando em banho maria a 80°C por 10, 20 e 30 minutos. As soluções foram neutralizadas com NaOH e o volume completado para 30 ml.

De cada uma das três soluções tomava-se 5ml e 5ml de solução enzimática (100mg de protease de S. griseus em 50ml de tampão fostato pH 7.5), em banho maria a 40°C durante 24 horas. Após o resfriamento e filtração em papel de filtro efetuavam-se os testes de precipitação com ácido clorídrico e reação colorida de McCarthy e Sullivan modificada por Tannenbaum (1969).

Para experimentos posteriores ficou escolhido o tempo de vinte minutos de pré-tratamento com ácido fraco, como sendo adequado, por apresentar melhores resultados durante os testes efetuados.

Com o objetivo de verificar se este tipo de tratamento facilitava a atuação da enzima, 5 ml de uma solução pré tratada e de uma solução controle (substrato suspenso em água) foram deixadas com solução de protease por 3, 6, 8, 18 e 24 horas em banho-maria a 40°C. As proteínas não digeridas após estes tempos de reação foram precipitadas com TCA 5% e filtradas em papel de filtro fazendo-se a leitura da absorbância a 280 nm.

O tratamento ácido prévio permitiu uma maior atividade da enzima que levou a que se pensasse em otimizar o tempo de hi-



drólise para maior produção de cor da reação de complexação de nitroprussiato de sódio com metionina. Amostras de 5 ml de solução pré-tratadas com ácido, de acordo com o procedimento já descrito foram incubadas por intervalos de 1, 2, 3, 4, 6, 18 e 24 horas a 40°C, após os quais os hidrolisados filtrados em papel de filtro foram submetidos a reação colorimétrica de McCarthy e Sullivan pelo procedimento de Tannenbaum (1969).

Uma vez escolhido o melhor tempo de hidrólise, procedeu-se o pré-tratamento ácido em quatro variedades de feijão, seguido por hidrólise com 5 ml de solução enzimática por 8 horas. No filtrado do hidrolisado fez-se a determinação colorimétrica de metionina de acordo com a metodologia descrita por Tannenbaum (1969). A finalidade destas determinações foi verificar a extensão da reação após o tratamento ácido.

### 3.2.2.3. Modificação do Método de Hidrólise

Os resultados dos testes acima descritos levaram a conclusão de que se fazia necessária uma modificação da metodologia de hidrólise quando se tratava de proteínas cruas de feijão. Um aumento do volume da solução foi necessária para permitir maior homogenização da solução de protease e substrato.

Outra modificação que prevaleceu para os testes posteriores consistiu em preparar a solução enzimática com 100 mg de protease de S. griseus em 100 ml de água destilada para ser utilizada na sua totalidade, ao contrário da solução dissolvida em tampão fosfato que devia ser centrifugada, para posteriormente ser utilizado apenas o sobrenadante.

Com a finalidade de verificar se a modificação surtia

efeito realmente foram novamente feitos os testes de atividade enzimática do modo de adição da enzima, do cociente enzima/substrato e do tempo de duração da hidrólise, como já havia sido feito para o procedimento não modificado.

### 3.2.3. Estudo da Reação Colorimétrica

Em vista das modificações que foi necessário introduzir no procedimento de hidrólise, resolveu-se também verificar os parâmetros que influem na reação colorimétrica.

#### 3.2.3.1. Efeito da Concentração de Ácido

Observou-se que quando o ácido clorídrico utilizado - na reação colorimétrica era proveniente de garrafas mais velhas, produzia-se um complexo colorido de cor mais intensa e não havia formação de bolhas na mistura final que dificultam a leitura no espectrofotômetro. Baseado nesta observação pensou-se que a concentração do ácido não estivesse otimizada segundo os procedimentos citados na literatura.

Estudando-se então o efeito desse parâmetro na produção da cor vermelha, testando-se as concentrações de ácido clorídrico 2, 4, 6, 8, 10 e 12 N, usando a L metionina e um hidrolisado proteico de feijão como fontes de metionina complexável.

#### 3.2.3.2. Efeito da Concentração de Nitroprussiato de Sódio

Tendo em vista as modificações que se fizeram necessárias na aplicação desta metodologia à proteína de feijão, foi determinada também, como precaução, a dependência da intensidade da cor vermelha da concentração do nitroprussiato de sódio. O procedimento foi o mesmo que o do item anterior para a preparação de hidrolisados e padrões, o que variou no procedimento colorimétrico foram só as concentrações das soluções de nitroprussiato de sódio (p. a. Merck), que passaram a ser 0.5, 0.75, 1.00, 1.25, e 1.50%. A concentração do ácido clorídrico empregado foi 8 N.

### 3.2.2.3. Curvas Padrão das Formas de Oxidação do Aminoácido.

Após o estudo de todos estes parâmetros curvas padrão de soluções preparadas com L metionina, sulfóxido de metionina e sulfona de metionina foram preparadas, pelo procedimento modificado por Tannenbaum (1969) para testar a capacidade de cada forma desenvolver cor. A solução inicial tinha 1 meq de aminoácido por 1 ml de água. A partir desta diluição obtinha-se as seguintes: 0.50; 0.25; 0.125; 0.625 mEq/ml. Depois de efetuada a reação colorimétrica (é descrito no item 3.3.) as curvas de cada forma do aminoácido foram traçadas pelo método dos mínimos quadrados.

### 3.3. MÉTODO MODIFICADO PARA AVALIAÇÃO DE METIONIA QUIMICAMENTE DISPONÍVEL. PROCEDIMENTO FINAL.

As modificações que preveleceram para as análises definitivas podem ser divididas em modificações na reação de hidrólise e na reação colorimétrica.

### 3.3.1. Hidrólise Enzimática

Na hidrólise enzimática, as modificações consistiram em:

19) Abandonar o uso de tampão fosfato pH 7.5 na preparação da solução enzimática por causa da interferência dele no desenvolvimento da reação colorida. O tampão foi substituído por água destilada resultando num pH final de 5.2 a 5.5. A relação de protease e água na solução de 1:100 ou seja cada ml da solução correspondia a 1 mg da protease.

29) A relação enzima/substrato foi fixada em 1:20, e a solução enzimática foi utilizada na sua totalidade já que a dissolução era completa e não apenas o sobrenadante como quando a solução era preparada com tampão.

39) O tempo de hidrólise foi reduzido de 24 para 8 horas e a temperatura do banho-maria empregado ficou sendo 40° C.

Os hidrolisados resfriados e filtrados em papel de filtro foram submetidos a reação colorimétrica.

### 3.3.2. Reação Colorimétrica

Em um tubo de ensaio colocava-se 1 ml do hidrolisado filtrado com 0.5 ml de hidróxido de sódio 5 N agitando-se lentamente. Em seguida adicionava-se 0.8 ml de solução de nitroprussiato de sódio 1% com agitação lenta, e por último 1 ml do ácido clorídrico 8N. A leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer 356 era feita a 510 nm após 5 minutos de adição do ácido.

#### 3.4. MÉTODO USADO POR MOREIRA ET AL:

Estes autores propuseram um método para determinar metionina em diferentes variedades de feijões brasileiros encontrando bons resultados. Foi por isto utilizado para comparar com o método modificado neste trabalho, na determinação de metionina de quatro variedades de feijão seguindo este procedimento a hidrólise enzimática de 1.7 g de farinha de feijão foi feita em erlenmeyer em banho-maria a 50° C com uma solução enzimática que continha: 250 mg de papaína, 5 ml de solução de hidrólise (186 mg de EDTA, 25 ml de cianeto de sódio 10% e 10 ml de tioglicol 0.5% volume final de 500 ml) e 10 ml de tampão tris-HCl pH 7.2.

O tempo de hidrólise recomendado no método original é quatro horas mas no caso do presente experimento foi preciso que se estudasse novamente este parâmetro. Variou-se o tempo de incubação por 2,4, 6, 8, 18 e 24 horas. O tempo mais adequado que se encontrou para a determinação de metionina foi 8 horas.

Depois da incubação de 8 horas a reação enzimática terminava com a adição de 6 gotas de ácido fosfórico a 85% e aquecimento a 65° C por 10 a 15 minutos. Uma vez resfriado o hidrolisado procedia-se a filtração em papel de filtro.

Para a reação colorimétrica tomaram-se 2 ml de filtrado do hidrolisado, 0.5 ml de hidróxido de sódio 3M e 0.5 ml de nitroprusiato de sódio 0.5% procedendo-se uma agitação branda por 6 minutos e adicionando finalmente 1.0 ml de ácido fosfórico 8 M. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro Perkin Elmer 356, a 515 nm. Com este procedimento determinou-se o teor de metionina de quatro variedades de feijão para comparar com o método modificado proposto neste trabalho.

### 3.5. DETERMINAÇÃO DE METIONINA E CISTEÍNA TOTAL POR OXIDAÇÃO.

#### 3.5.1. Preparação de Padrões

Foram pesados 0.5 mmoles de metionina (74.6 mg) e de cisteína (60.6 mg) para serem oxidadas segundo Jamalian e Pellet (1968). Os dois aminoácidos foram oxidados com 50 ml de solução oxidante que era preparada duas horas antes de ser utilizada e continha 72 ml de ácido fórmico, 7.5 ml de água oxigenada (32%) e 1.5 ml de metanol. Para que houvesse oxidação completa era preciso que a solução fosse deixada por 18 horas em geladeira.

Antes da solução ser evaporada adicionou-se 4 ml de ácido bromídrico. Em seguida, lavou-se uma vez com água, que também foi evaporada em rotavapor até quase a secura. O balão de evaporação era lavado e o volume foi completado para 50 ml, ficando a solução com 10 umoles de amostra por ml de solução, que foi deixada no freezer em frascos plásticos até o momento do uso.

No momento de ser utilizado, este padrão foi diluído na proporção de 1:10 e desta diluição 1 ml foi dissolvido em 1 ml de tampão citrato pH 2.2 para ser passado no analisador de aminoácidos modelo Beckman 120 C de acordo com as condições que serão descritas abaixo.

#### 3.5.2. Preparação de Amostras

A farinha de feijão (100 mg) foi oxidada segundo a mesma metodologia descrita para os padrões, só que após a lavagem com água no rotavapor, para retirada do ácido bromídrico, efetuou-se a hi-

drólise ácida. O procedimento foi o seguinte: colocavam-se 10 ml de HCl 6 N no balão de evaporação usando o ácido para extrair o produto e lavar o balão. Lava-se mais uma vez com um pouco de ácido e juntavam-se as alíquotas em um tubo F/L com tampa de rosca e arruela de teflon, completou-se o volume do tubo e deixou-se hidrolisar em estufa a 110° C por 22 horas.

Quando o tubo retirado da estufa esfriasse procedia-se a filtração em funil de vidro poroso fino a vácuo, completando o volume para 50 ml com água destilada. Somente 10 ml do filtrado foi evaporado usando a bomba de vácuo e fizeram-se três lavagens com 10 ml de água destilada cada vez. Após as lavagens extraía-se o evaporado do balão com 5.0 ml de tampão citrato pH 2.2 injetando-se 0.2 ml na coluna de analisador de aminoácidos modelo Beckman 120 C cujas condições foram: coluna foi a mesma que a utilizada para a separação cromatográfica de aminoácidos neutros e ácidos ( 50 cm de comprimento e temperatura 55° C), resina AA-25 da Beckman, Ins, Palo Alto, Califórnia e os tempos de eluição foram em média 12 e 39 minutos para ácido cisteico e metionina sulfona respectivamente.

### 3.6. DIGESTIBILIDADE DAS AMOSTRAS ARMAZENADAS

A digestibilidade das amostras foi determinada utilizando-se um teste químico. Todas as amostras tanto as que sofreram armazenamento como as que não sofreram o armazenamento foram submetidas a hidrólise com protease de Streptomyces griseus, por tempos diferentes como se fez para o caso de determinação da atividade enzimática. Após a hidrólise procedia-se a precipitação de 1 ml do hidrolisado com uma solução de TCA 5%, filtração após quarenta minutos e leitura da absorbância do filtrado a 280 nm.

Este teste foi feito para ver se havia uma queda da digestibilidade dos feijões durante o armazenamento a qual se poderia atribuir qualquer variação ocorrida na quantidade de metionina detectada.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O nível proteico das doze variedades de feijão analisadas variou entre 22.92 e 31.05%, com uma porcentagem média de 28.42% de proteína. A variedade com maior porcentagem de proteína foi SP 7052 e a de menor teor de proteína a variedade Carioca. Como já era esperado encontrou-se que o índice de proteína não varia significativamente com o tempo de armazenamento.

O valor médio de 28,42% de proteína encontrados nas de terminações deste trabalho assemelha-se ao valor de 25% reportado por outros trabalhos (Moraes e Angelucci, 1971; Maneepaum et al. 1974). Sabe-se que o nível de proteína difere de uma variedade para outra e os dados foram obtidos de variedades diferentes da que se tomou como referência. Também o local do plantio, o ano da colheita, tipo de solo, o tipo de fertilizante empregado podem determinar variações do nível proteico estando portanto justificada a diferença encontrada nos resultados apresentados.

Os teores de proteína obtidos pelo procedimento da AOAC para determinação de nitrogênio em alimento, pelo método de Kejhdaahl estão na Tabela 3.

TABELA 3: Porcentagem de proteína dos feijões em base seca em função do tempo de estocagem (dias)

Amostras	0	60	150	240
Aeté I	29.1	30.2	30.1	30.0
Aeté II	31.0	30.9	30.6	30.6
Aroana	26.0	26.4	26.0	26.4
B. de Ouro	28.6	28.3	28.5	28.8
C. Suja	30.8	31.0	30.5	30.3
Carioca	23,7	22.9	24.2	23.3
G. Precoce	28.6	28.1	27.7	27.3
Piratã I	29.0	28.1	28.4	27.6
Piratã II	30.6	30.2	30.8	30.2
SC 7010	30.7	30.8	29.8	30.6
SP 7052	30.7	31.1	30.6	31.0
Rosinha G <sub>2</sub>	29.8	30.4	30.9	30.7

Com o decorrer da estocagem, a umidade dos grãos aumentou até aproximadamente 13%, para depois diminuir durante o quinto mes de armazenamento e de maneira mais acentuada houve queda da umidade no oitavo mes de armazenamento, como pode ser visto na Tabela 4. A análise de variância destas umidades foi significativa a nível de 1%.

Como pode ser observado na Figura 1 e também na Tabela 4 o maior aumento do teor de umidade dos grãos ocorreu no tempo inicial do armazenamento, até os 60 dias. Daí para os 150, 240 dias a diminuição da umidade encontrada não era esperada, pois o normal seria a estabilização do teor da umidade depois de um período de aumento, isto tudo em função da umidade relativa constante da atmosfera artificial.

A diminuição da umidade depois de 150 dias, portanto, acredita-se que tenha sido o resultado de dois fatores: um aumento excessivo da temperatura que não foi registrado ou um erro sistemático na preparação saturada de sulfato de amônio. A respeito deste segundo fator, sabe-se que o lote de sulfato de amônio utilizado na fase inicial da estocagem era diferente do que se usou depois dos 150 dias de armazenamento.

As condições de armazenamento não foram rigorosamente controladas devido a falta de equipamento especializado para este tipo de experimento no laboratório em que se desenvolveu esta pesquisa, fazendo-se necessário trabalhar em condições adaptadas. A temperatura do meio ambiente onde foram armazenadas

TABELA 4: Porcentagem de Umidade dos feijões em função do tempo de estocagem (dias)

Amostras	0	60	150	240
Aeté I	7.7	12.7	12.1	11.2
Aeté II	8.2	13.3	12.2	9.9
Aroana	8.3	13.2	13.1	10.3
B. de Ouro	8.3	12.3	13.0	10.5
C. Suja	7.7	13.5	12.3	11.8
Carioca	7.9	12.7	10.6	10.8
G. Precoce	7.9	12.5	11.8	11.1
Piratã I	7.9	13.0	12.3	9.9
Piratã II	8.2	11.5	13.1	11.7
SC 7010	8.7	12.7	12.1	10.3
SP 7052	8.0	12.6	13.1	9.9
Rosinha G <sub>2</sub>	7.7	12.0	13.3	10.2

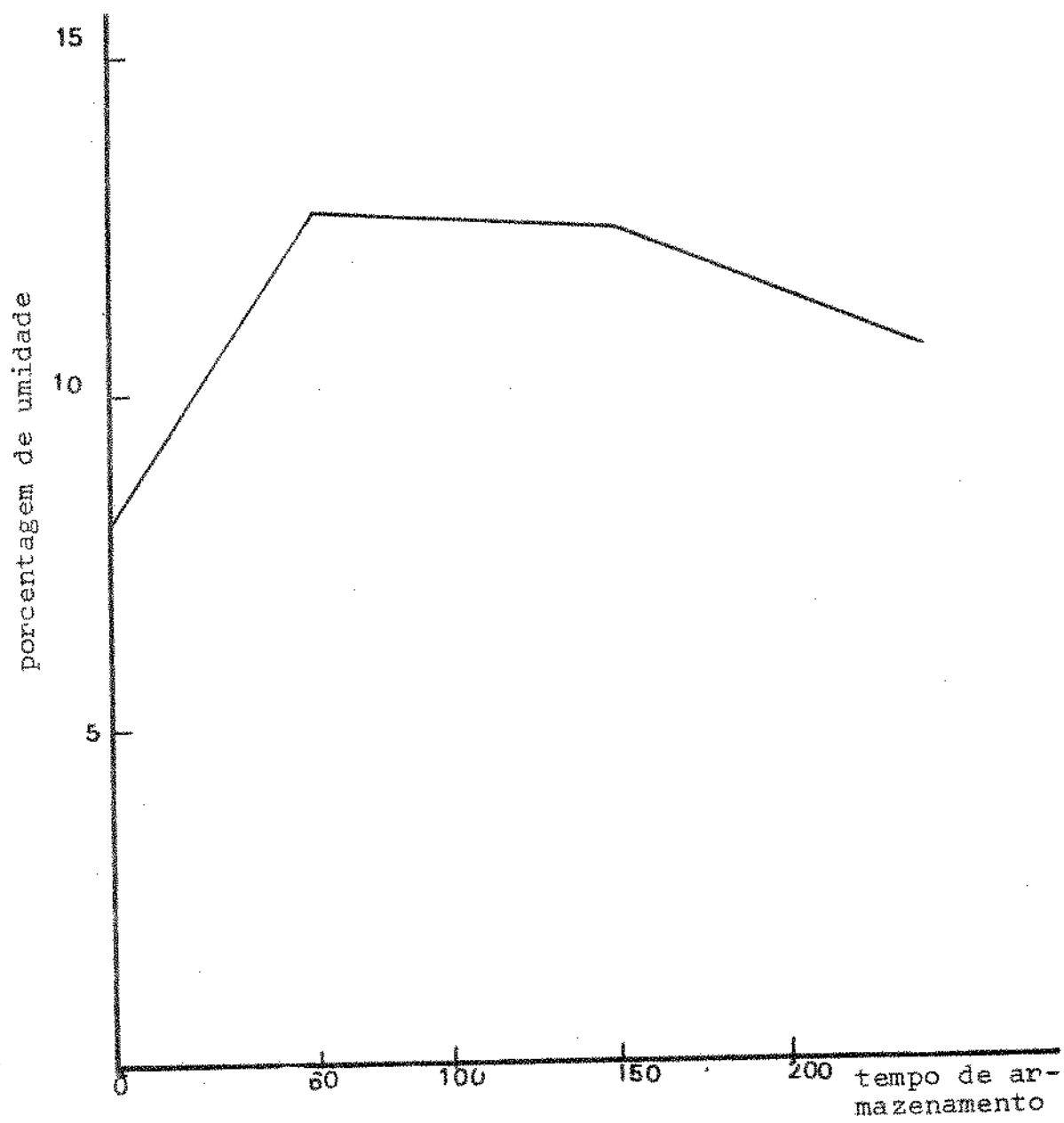


FIGURA 1: Variação média da porcentagem de umidade das doze variedades de feijão com o tempo de armazenamento.

as cubas variou o menos possível, com as variações do clima, manteve-se entre 20 - 26° C durante todos os meses de armazenamento. A variação como se pode ver não foi tão drástica considerando-se que o local de armazenamento não foi uma estufa cuja temperatura pudesse ser controlada mais adequadamente. Também não se dispunha de estufas com umidade relativa controlada que pudessem manter o ambiente com saturação constante durante todos os meses de armazenamento dos grãos. Para corrigir, na medida do possível esta falha o que se fazia era mudar a solução do sulfato de amônio saturada, que teoricamente deveria conferir uma umidade relativa do ar de 80%, de cada duas semanas. Talvez tenha havido um erro na preparação destas soluções de sulfato de amônio e inicialmente a umidade relativa conferida ao ambiente deve ter sido alta, com queda depois de 150 dias e as amostras tiveram seu teor de umidade diminuído para atingir um estado de equilíbrio com o ambiente.

Na Tabela 5 temos os dados obtidos quando se fez a análise estatística da variação da porcentagem de umidade das doze variedades de feijão durante os oito meses de armazenamento. Por blocos tomou-se as porcentagens de umidade das doze variedades de feijão, os quatro tempos de armazenamento que são ditos tratamentos. Pode-se concluir por esta tabela que houve variação significativa da porcentagem de umidade durante os tempos de armazenamento a nível de 1 e 5%.

TABELA 5: Análise de Variância da porcentagem de  
Umidade X Tempo de Armazenamento

Causas de Variação	Gl	SQ	SQM	Fe	
Blocos	11	2.11	0.19	6.03	
Tratamentos	3	164.68	54.89	10.02	**
Resíduo	33	180.93	5.48		
Total	47	14.14	0.03		

Na Tabela 6, aparece a composição de aminoácidos de doze linhagens de feijão, determinadas estas quantidades de aminoácidos em analisador de aminoácidos modelo Beckman 120C. Observa-se que os valores de metionina e cisteína obtidos diretamente do analisador, depois de hidrólise ácida normal, estão sujeitos a alto erro devido às baixas quantidades em que eles se encontram. Isto, além das considerações já mencionadas na revisão bibliográfica. Os valores comumente fornecidos como "certos" para os aminoácidos sulfurados são os correspondentes aos níveis totais estão na Tabela 7. Mesmo considerando os valores da Tabela 7, uma comparação rápida destes níveis com o padrão de requerimento de aminoácidos essenciais fica demonstrado que são estes os primeiros aminoácidos limitantes no feijão. Em seguida está a isoleucina que em todas as variedades é encontrada numa proporção de mais ou menos a metade da que é citada como sendo ideal pelo padrão e finalmente a valina, que aparece como sendo aproximadamente dois terços da quantidade referida pelo padrão.

Estas observações estão de acordo com os resultados de Moraes e Angelucci (1971) que encontraram estes mesmos aminoácidos em baixa quantidade quando trabalharam com doze variedades de feijões brasileiros. Outros autores como Evans et al. (1967), Kapoor et al. (1972), Jaffé (1973), Bressani (1973) e Janjic (1975) já citam a metionina como sendo o aminoácido mais limitante de todas as variedades de leguminosas. Outros aminoácidos que são encontrados em pequenas quantidades também podem variar com diversos fatores, tais como variedades estudadas, tipo de solo, ano de colheita e outros, diferindo de trabalho para trabalho a proporção em comparação com o padrão da FAO, mas, de maneira geral, para feijões os três aminoácidos metionina, isoleucina e valina são os que mais comumente se encontram em baixa quantidade.





#### 4.2. ESCOLHA DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA METIONINA.

Pelas razões já expostas no ítem 2.2.4. é interessante conhecer a quantidade de metionina nutricionalmente disponível, uma vez que ela é um aminoácido essencial para organismos animais, e nem toda metionina presente num alimento pode ser aproveitada.

A metionina total pode ser determinada por oxidação exaustiva com ácido perfórmico seguida por separação cromatográfica e determinação colorimétrica da metionina. Mas como nem toda metionina presente num alimento pode ser aproveitada biologicamente faz-se necessário o desenvolvimento de um método analítico que permita distinguir entre a metionina alterada, ou seja, aquela que não tem valor nutricional, e a metionina intacta presente no alimento.

O nitroprussiato de sódio, reagente de especificidade relativamente boa, foi utilizado num método descrito por McCarthy e Sullivan em 1941. O método é baseado na propriedade que tem a metionina reduzida de formar um complexo com o nitroprussiato de sódio desenvolvendo cor vermelha ao passar de um meio básico para um meio ácido. Para formação do complexo é preciso que a metionina presente na proteína, além de reduzida esteja estericamente desimpedida. A hidrólise ácida foi muito bem sucedida no método de McCarthy e Sullivan porque além de resolver o problema do impedimento estérico, também destruiu o triptofano que, através de um complexo colorido formado com o reagente, interferia na determinação da metionina. A interferência da histidina<sub>na</sub> reação colorida era evitada pelo uso da glicina no meio.

Várias modificações foram feitas neste método para

que pudesse ser aplicado numa série de substratos, mas até hoje a capacidade do método para determinar metionina nutricionalmente disponível não foi explorada.

Tannenbaum et al. (1969) desenvolveram um procedimento modificando o método de McCarthy e Sullivan que permitia distinguir a metionina de seus produtos de oxidação, o sulfóxido e a sulfona. Mas com este método ocorria o problema de não poder ser utilizado para determinação em proteínas com baixo teor de metionina, devido a baixa sensibilidade da reação do ferricia<sub>2</sub> neto de sódio e da possível interferência de pigmentos de amostra no desenvolvimento da cor.

Apesar destas desvantagens este procedimento chamou a atenção por ser capaz de distinguir entre as formas de metionina reduzida e as oxidadas. A hidrólise proposta pelo método é enzimática, evitando portanto a transformação da forma parcialmente oxidada, em forma reduzida e ainda o reagente empregado na reação colorimétrica é de fácil obtenção e manipulação. Assim pensou-se em testar a capacidade deste método para avaliação de metionina, efetuando as modificações que se fizessem necessárias para aplicá-lo a feijões que tem baixo teor de metionina.

Inicialmente parecia que o maior problema seria a pequena quantidade de metionina presente nos feijões e que as modificações precisariam ser no sentido de aumentar a sensibilidade da reação colorimétrica. Não se contava com o aparecimento de problemas com a hidrólise enzimática, pois se estava trabalhando com protease do Streptomyces griseus que, além de ser inespecífica é uma enzima proteolítica potente. Houve porém a formação de um precipitado com a adição de ácido durante a reação colorimétrica que, segundo McCarthy e Sullivan, é devido a presença de peptídeos grandes ou proteínas não hidrolisadas. Embora não se

possa afirmar que o precipitado seja exclusivamente causado pela presença de tais peptídeos e proteínas, isto é, que não exista também alguma interação com outros componentes do grão. Trabalhou-se portanto partindo da premissa que os inibidores enzimáticos do feijão estivessem dificultando a ação da enzima nas condições de hidrólise empregadas inicialmente.

#### 4.3. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO

##### 4.3.1 Hidrólise Enzimática

A protease do Streptomyces griseus é uma enzima proteolítica não específica que pelos trabalhos de Johnson e Smillie (1972) atua como uma asparargina-serina-glicina-serina protease que parece ser mais semelhante a protease alfa lítica do Myxobacter 495 que com qualquer outra serina protease. Para o caso do presente trabalho não importa o fato dela não atuar de maneira específica na cadeia polipeptídica uma vez que a função dela é reduzir o tamanho das cadeias até o ponto de eliminar os resíduos que impedem estericamente a metionina e evitar a precipitação de peptídeos grandes com adição de ácido durante a reação colorimétrica.

O procedimento para uso da hidrólise enzimática com protease foi descrito por Spies (1967) no seu método para determinação de triptofano, só que a temperatura do banho utilizado foi 40°C pois nesta temperatura a enzima não tinha atividade alterada e o banho-maria empregado para incubação tinha a sua temperatura controlada mais facilmente podendo ser mantida constante durante o tempo necessário. A concentração da solução enzimática utilizada por Spies era 1%, mas partiu-se de uma solução de

0.2% de enzima preparada em tampão fosfato pH 7.5

#### 4.3.1.1. Atividade Enzimática

Antes de se iniciar o experimento para padronização das condições de hidrólise testou-se a atividade enzimática da protease escolhida com caseína, através do método de precipitação com ácido tricloroacético (TCA). Após incubar o substrato por tempos diferentes procedia-se a precipitação e filtração das proteínas e polipeptídeos de alto peso molecular, enquanto que os aminoácidos livres passavam para o filtrado. Pela leitura da absorbância do filtrado a 280 nm em espectrofotômetro avaliava-se a extensão da hidrólise. Na primeira hora de hidrólise, o aumento da absorbância foi rápido, devido principalmente ao elevado peso molecular do substrato inicial. Já na segunda hora de hidrólise a absorbância aumentou mais lentamente até se estabilizar na terceira hora de hidrólise, significando que toda proteína foi hidrolizada pelo menos parcialmente.

Foram utilizadas duas quantidades de substrato para se ter certeza da saturação da enzima com o substrato. O ocorrido durante o experimento pode ser visto na Figura 2.

Quando o teste da atividade enzimática foi a reação colorimétrica de McCarthy e Sullivan após hidrólise por 24 horas, ao contrário do teste anterior os resultados não foram tão satisfatórios. Utilizando como substrato para a enzima a caseína, milho (variedade normal verde) e feijão Rosinha G<sub>2</sub>, e os hidrolisados foram submetidos a reação colorimétrica (Tannenbaum, 1969). Para a caseína e milho foi possível observar desenvolvimento de cor com o ferricianeto de sódio e fazer a leitura da

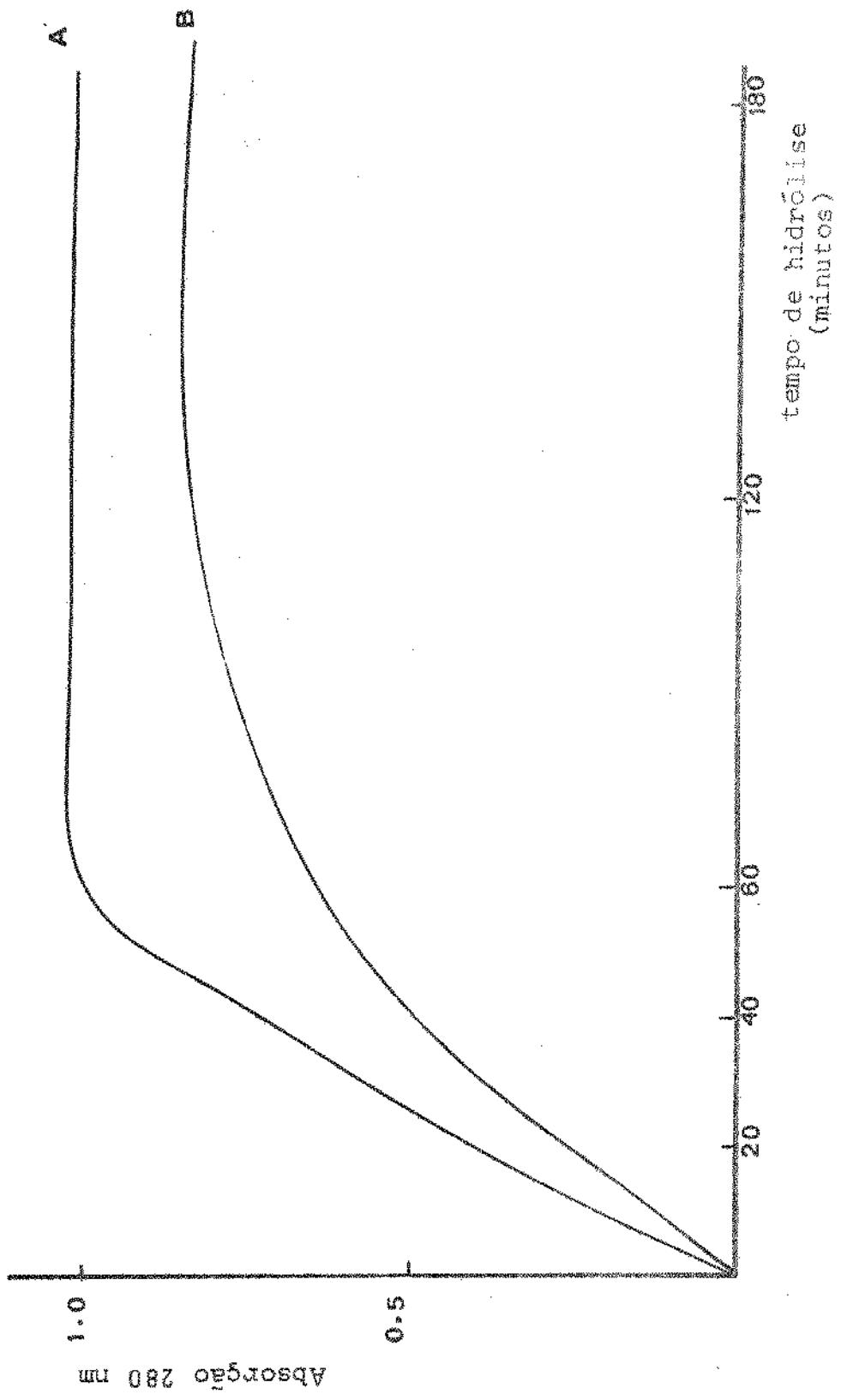


FIGURA 2: Atividade enzimática da Protease de *S. griseus*.

Substrato: caseína A - 200mg

B - 100mg

absorbância do complexo em espectrofotômetro a 510 nm, apesar de que o resultado encontrado não estivesse de acordo com o esperado. O hidrolisado de feijão, porém apresentou um precipitado que impedia qualquer leitura, ainda que se pudesse observar cor vermelha na suspensão.

Com estes testes acreditou-se que a capacidade proteolítica da enzima provavelmente estava sendo diminuída nas condições de hidrólise. Isto é, apesar de ter-se efetuado a hidrólise das proteínas, pelo menos no caso do feijão, a extensão dela não era suficiente para fornecer peptídeos solúveis em ácido.

#### 4.3.1.2. Estudo das Condições de Hidrólise

Na tentativa de resolver o problema aparecimento de precipitado, procurou-se otimizar as condições de hidrólise variando a concentração da enzima, adicionando a enzima numa aliquota inicial e completando a quantidade desejada com adições parceladas (Tabela 2), e ainda estudando o efeito do tempo de hidrólise.

Pode-se verificar que para haver produção de cor foi necessário uma concentração mínima da enzima de 0.2%. Concentrações maiores de enzima não melhoraram os resultados, razão pela qual decidiu-se que a relação enzima-substrato permaneria 1:20.

Como se ve na Tabela 2, tentou-se adicionar os 5 ml de enzima, utilizados para obter uma relação de enzima-substrato de 1:20, parceladamente. No entanto, não se observou melhoria alguma, o precipitado continuava aparecendo com a adição de ácido.

Pela avaliação visual da cor desenvolvida, verificou-se que tempos de hidrólise menores que quatro horas não deveriam ser usados, embora não fosse possível determinar o melhor tempo devido ao aparecimento de precipitado em qualquer dos tempos de incubação.

#### 4.3.1.3. Testes para Eliminar ou Diminuir a Interferência dos Inibidores da Proteólise.

Por se estar trabalhando com farinha de feijão cru, que é uma fonte de vários inibidores da proteólise enzimática, pareceu conveniente aplicar alguns processos de desnaturação às proteínas do feijão, antes de submetê-las a hidrólise.

O primeiro tratamento consistiu em desnaturar termicamente as proteínas de feijão, submetendo os grãos inteiros a cozimento com água em panela aberta por trinta minutos. Após liofilização os grãos foram moídos até a obtenção de farinha de 100 mesh, que foi hidrolizada pelo processo habitual. Constatou-se que apesar, deste tratamento, continuava aparecendo o precipitado quando se adicionava ácido ao hidrolisado.

O segundo tratamento foi uma pré-digestão ácida branda com ácido clorídrico 1 N a 80°C, seguida por neutralização da solução antes de submetê-la a ação de enzima proteolítica. O pré-tratamento deu bons resultados com algumas variedades testadas, ou seja não havia mais formação de precipitado, e durante a reação colorimétrica aparecia a cor vermelha. Estudando o tempo de pré-tratamento verificou-se com vinte minutos os melhores resultados, porém três problemas surgiram com este procedimento.



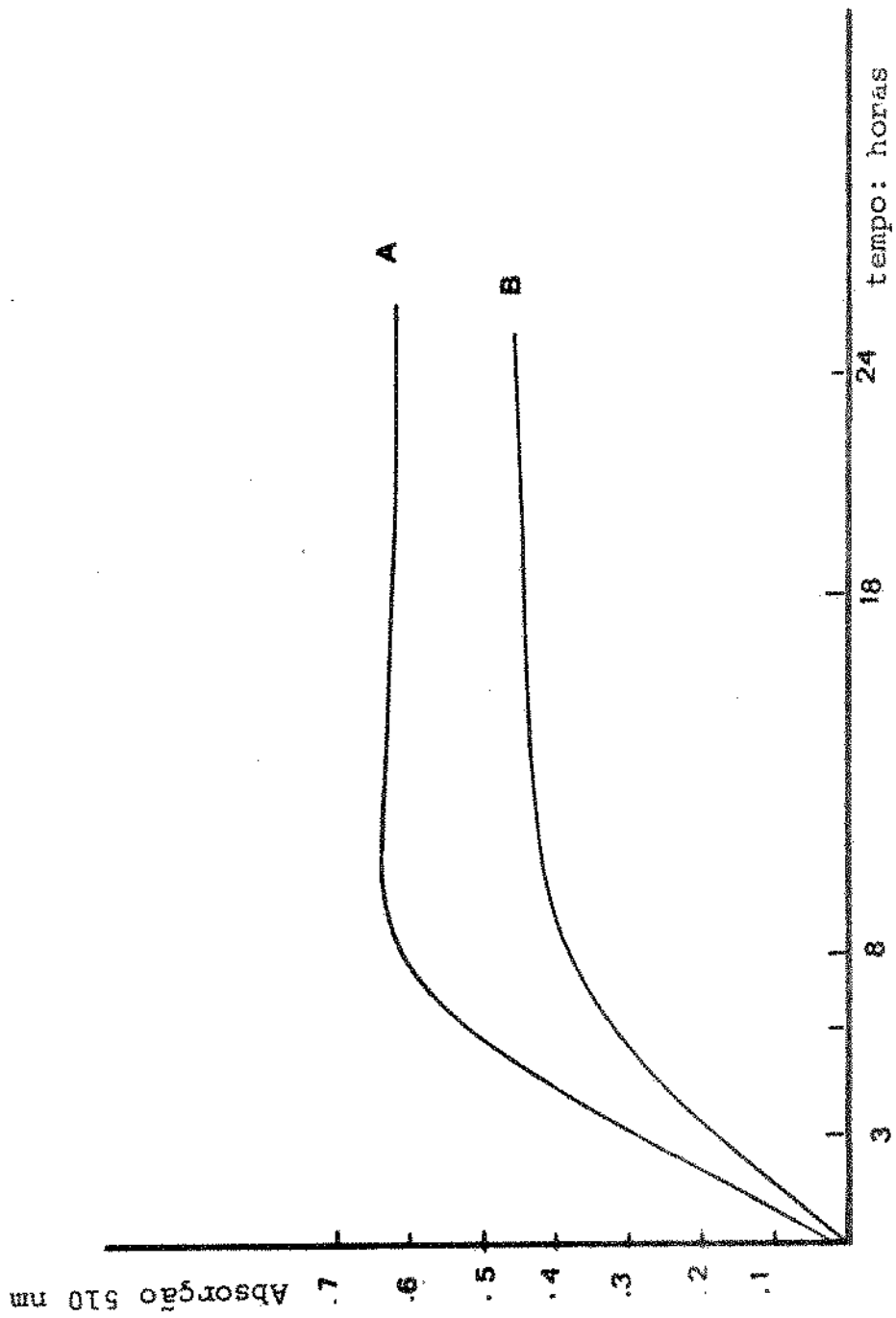


FIGURA 3: Aumento da atividade enzimática da protease de S. griseus com o pré-tratamento ácido.

Substrato A: farinha de feijão pré-tratada

Substrato B: farinha de feijão sem pré-tratamento

A primeira dificuldade foi a impossibilidade de controlar a pré-digestão, que ocasionava uma falta de reprodutibilidade de resultados entre as mesmas variedades quando sofriam este tratamento. O segundo problema foi o aparecimento de um gel, que dificultava o manuseio da amostra para a leitura da reação colorimétrica em espectrofotômetro. Finalmente, o emprego de hidrólise ácida, mesmo que branda produz mudança nos pigmentos, de algumas variedades, o que, por sua vez, ocasionou interferências colorimétricas.

O pré-tratamento ácido cumpria o objetivo de eliminar a precipitação do hidrolisado em meio ácido, porém as outras dificuldades surgidas fizeram com que se abandonasse este tratamento. Porém ele veio confirmar a idéia inicial de que a reação enzimática estava sendo prejudicada pela presença de inibidores intrínsecos. Na Figura 3 pode-se verificar o aumento da atividade da protease associada com a desnaturação produzida durante o pré-tratamento ácido.

O gel, até agora de origem desconhecida, que se formou com algumas variedades quando submetidas ao tratamento ácido prévio. Sabe-se a este respeito que Mc Cready et al. (citado por Scamparini, 1978) propôs um método onde pectinas desesterificadas por ácido ou alcali podem ser precipitadas por ácido em temperaturas inferiores a 25°C, desde que tenham 4% de grupos metoxila e uma certa viscosidade intrínseca. Pelo tipo de tratamento que se submetia a farinha de feijão poder-se-ia pensar que este gel formado se devesse a precipitação de pectinas, mas sua existência em feijões não é conhecida. Considerando-se que a desnaturação prévia com ácido foi positiva, no sentido de reduzir a inibição enzimática, pensou-se em suprimir ou eliminar a ação dos inibidores mudando as condições de pH da reação enzimática.

tica, não incorrendo assim em mudanças desfavoráveis.

#### 4.3.1.4. Modificação do Método de Hidrólise

O método de Tannenbaum et al. (1969), para determinação de metionina, só tem sensibilidade quando 1 ml do hidrolisado que é empregado na reação colorimétrica contiver 0.1 a 1 mg de metionina. Tomando-se 200 mg de farinha de feijão, que tinha em média 28.42% de proteína, para ser hidrolisado com 5 ml de solução enzimática, cada ml da solução continha teoricamente 0.8 mg de metionina. Portanto, a quantidade de metionina contida no hidrolisado era suficiente para satisfazer a sensibilidade do método.

Considerando-se que a quantidade de farinha de amostra originalmente sugerida para a mistura hidrolítica era relativamente alta para um volume de solução enzimática pequeno, foi necessário modificar o volume da solução para obtenção de uma solução menos viscosa. Embora sem alterar a concentração da enzima, o volume empregado aumentou. A segunda modificação consistiu em dissolver protease de Streptomyces griseus em água, o que proporcionava ao meio um pH em torno de 5.5, eliminando a possível interferência dos íons fosfato do tampão no sistema hidrolítico. Neste caso não foi necessário centrifugar a solução enzimática, já que esta constituía uma solução límpida.

No primeiro experimento, sem qualquer modificação além do aumento de volume e a precipitação da solução enzimática, verificou-se que o teste de precipitação em presença do ácido clorídrico era negativo. A partir daí foram feitos estudos para otimizar condições de hidrólise com as modificações introdu-

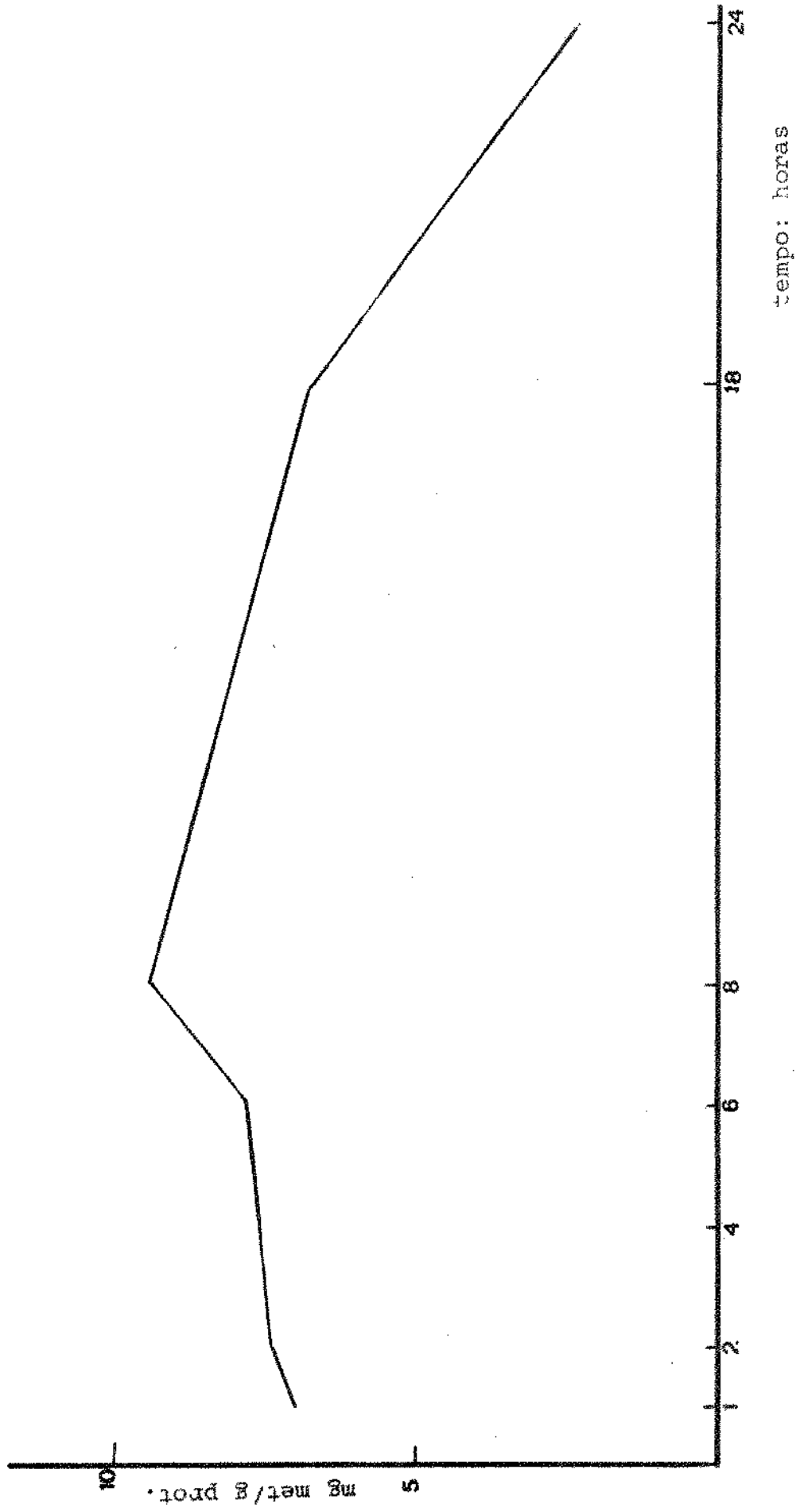


FIGURA 4: Efeito do tempo de hidrólise na quantidade de metionina detectada.

zidas.

Quanto a influência do tempo de hidrólise na quantidade de metionina detectada, um fato bastante interessante foi observado. Até oito horas de reação verificou-se um aumento da quantidade de metionina determinada pela reação colorimétrica, apresentando-se em seguida uma queda lenta e progressiva (Figura 4). O fenômeno foi observado inclusive quando se incubou uma quantidade conhecida de L metionina, tendo o amido como veículo, com a solução enzimática. Ainda quando se incubava uma solução de metionina de concentração conhecida com uma solução enzimática, também após 8 horas de incubação ocorria uma diminuição da quantidade de metionina determinada. Uma possível explicação para este fato é que a enzima ou a metionina liberada com o decorrer da hidrólise sofram degradação diminuindo a complexação de metionina com ferricianeto de sódio. A possibilidade da metionina ser utilizada por microorganismos durante a hidrólise, porém está descartada devido as precauções que foram tomadas.

A eliminação do precipitado que se obteve afinal, pelo uso de água ao invés de tampão fosfato como solvente da enzima pode ser atribuída a ausência dos íons fosfato como sendo favorável a estabilidade da enzima frente ao substrato feijão. Outro fato que pode justificar a eliminação do precipitado é o novo pH da solução de hidrólise, que ficou em torno de 5.2. a 5.5. De acordo com trabalhos feitos recentemente e ainda não publicados, ao redor destes pHs ocorre a precipitação dos inibidores proteolíticos de feijão permitindo uma ação satisfatória da enzima.

#### 4.3.1.5. Modificação da Reação Colorimétrica

Observando-se que quando o ácido clorídrico emprega-

do na reação colorimétrica era proveniente de garrafas usadas já durante um certo tempo, ocorria um desenvolvimento de cor mais intensa, sugerindo que a concentração do ácido poderia ser otimizada. Para concentrações de ácido entre 2 e 6 N não houve desenvolvimento de cor vermelha do complexo metionina-ferricianeto. Quando a concentração foi 8 N ocorreu um desenvolvimento de cor intensa sem o problema das bolhas de ar que interferiam na leitura colorimétrica, como nos casos em que se usaram concentrações de 10 e 12 N. Houve portanto a necessidade de modificar a concentração do ácido para 8 N.

Estudando o desenvolvimento da cor em função da concentração do reagente de McCarthy e Sullivan, observou-se que mudando a concentração do nitroprussiato de sódio empregado na reação para 0.5% não ocorria o desenvolvimento da cor do complexo, enquanto que concentrações superiores a 1% o branco da reação desenvolvia uma cor marron intensa que absorvia mais que as amostras. A concentração do nitroprussiato ficou em 1%

As soluções alcalinas de hidróxido de sódio e potássio não influenciaram na intensidade de cor apresentada pela solução ficando o hidróxido de sódio como reagente a ser utilizado para alcalinizar o meio nas análises posteriores.

De acordo com Tannenbaum et al. (1969), as condições de reação por eles utilizadas permitiram a distinção de metionina reduzida presente no meio daquela que se encontrasse na forma de sulfóxido porque o ferricianeto de sódio poderia se complexar desenvolvendo a cor característica com a metionina reduzida. Contrariando esta afirmativa, encontrou-se, ao serem preparadas as curvas padrão com as três formas de oxidação do átomo de enxofre do aminoácido, que a metionina reduzida e o sulfóxido podiam formar complexos com o rea-

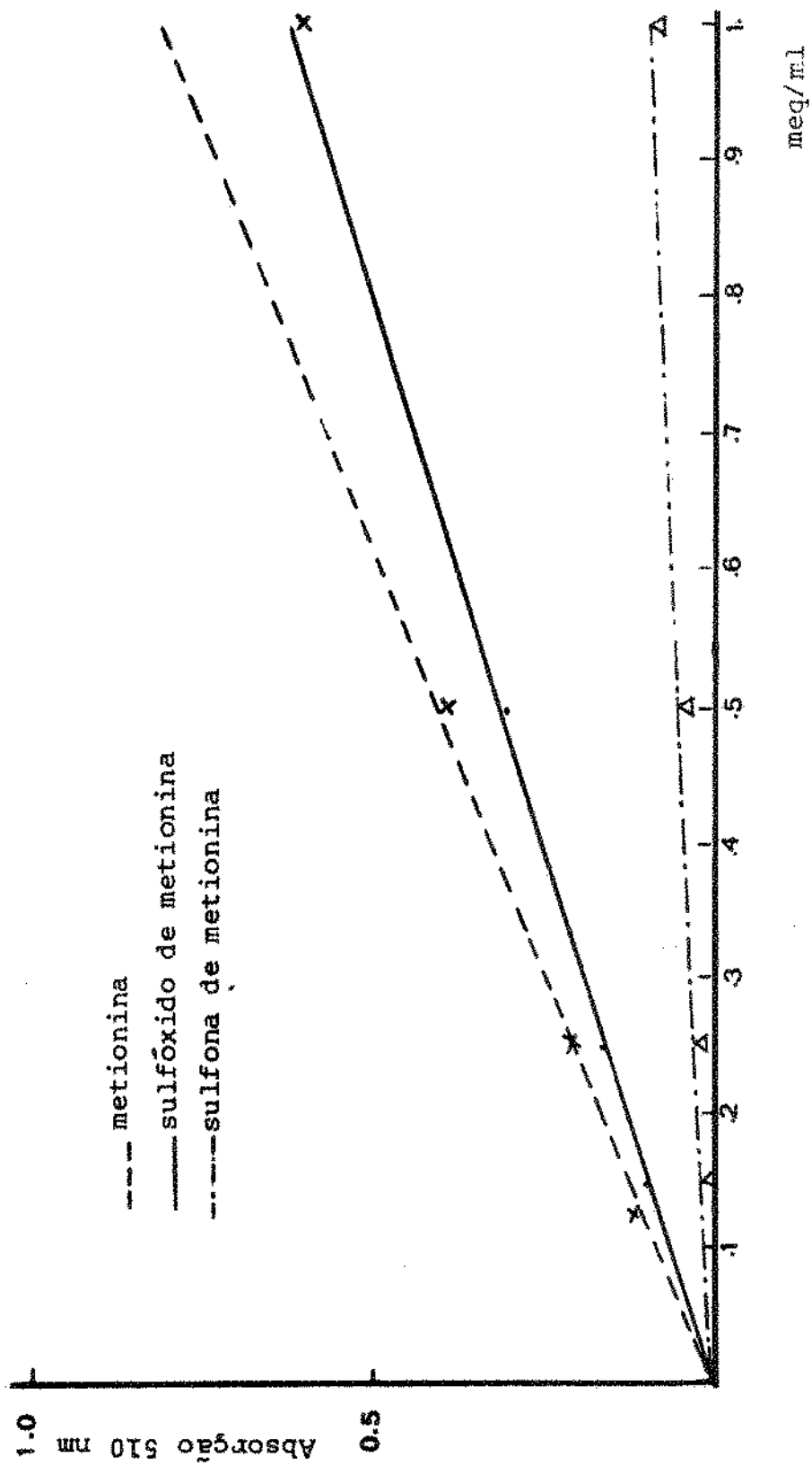


FIGURA 5: Curvas padrão dos estados de oxidação da metionina (método de Tannenbaum modificado).

gente de McCarthy e Sullivan, embora o sulfóxido desse uma curva padrão menos inclinada como pode ser visto na Figura 5. Só que a forma sulfona não deu reação com o nitroprussiato de sódio.

Este fato porém não desmerece o método no sentido de diminuir a sua potencialidade para ser utilizado na determinação de metionina nutricionalmente disponível uma vez que, como foi citado na revisão bibliográfica deste trabalho, o sulfóxido pode ser utilizado pelos organismos embora de maneira ligeiramente menos satisfatória que a metionina.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DE METIONINA EM DOZE VARIEDADES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.)

##### 4.4.1. Avaliação de Metionina Total

A determinação de metionina e cisteína total das doze variedades de feijão antes do armazenamento foi feita pelo método de oxidação total com ácido perfórmico, hidrólise ácida da amostra oxidada e passagem pelo analisador de aminoácidos para separação cromatográfica e determinação quantitativa das espécies sulfona de metionina e ácido cisteico.

Na preparação das amostras para passá-las pelo analisador foi necessário efetuar pequenas modificações do procedimento proposto por Jamalian e Pellet (1968) para otimizar a separação cromatográfica e determinação quantitativa de sulfona de metionina e do ácido cisteico, do meio do hidrolisado. Foram obtidos picos bem separados e com alturas que permitem o cálculo da área de maneira precisa, como ilustra a Figura 6.



A recuperação foi testada oxidando uma quantidade de L metionina e cisteína conhecida junto com uma amostra de feijão comercial, fornecendo os valores de 91% e 87% para metionina e cisteína respectivamente.

A Tabela 7 mostra as quantidades de metionina e cisteína encontradas com o método de oxidação total em mg/g de proteína.

A análise de variância dos resultados mostraram que não houve diferença significativa (nível de 1%) entre os valores de metionina obtidos tanto pelo método de Jamalian e Pellet modificado como pelo método de Tannenbaum modificado, referente aos grãos que não foram submetidos a armazenamento.

Estes resultados indicaram que no início da estocagem, ou seja em feijões novos mantidos em umidades inferiores a 8.7%, quase a totalidade de sua metionina se encontra na forma reduzida, quimicamente disponível. As variedades SC 7010 e SP 7052, por razões desconhecidas, possuíam inicialmente baixas porcentagens de metionina complexável.

Na Tabela 8 pode-se observar os resultados de metionina determinados pelos dois métodos, dados em mg/g de proteína. Verifica-se que existe uma ampla variabilidade de metionina total entre as linhagens escolhidas, indo esta de 6.9 (cultivar Rosinha G<sub>2</sub>) até 13.74 (linhagem Cara Suja) mg/g de proteína.

Na Tabela 9 estão os resultados das médias obtidas de tres repetições da determinação de metionina complexável para as doze variedades durante os quatro tempos de estocagem estudados.

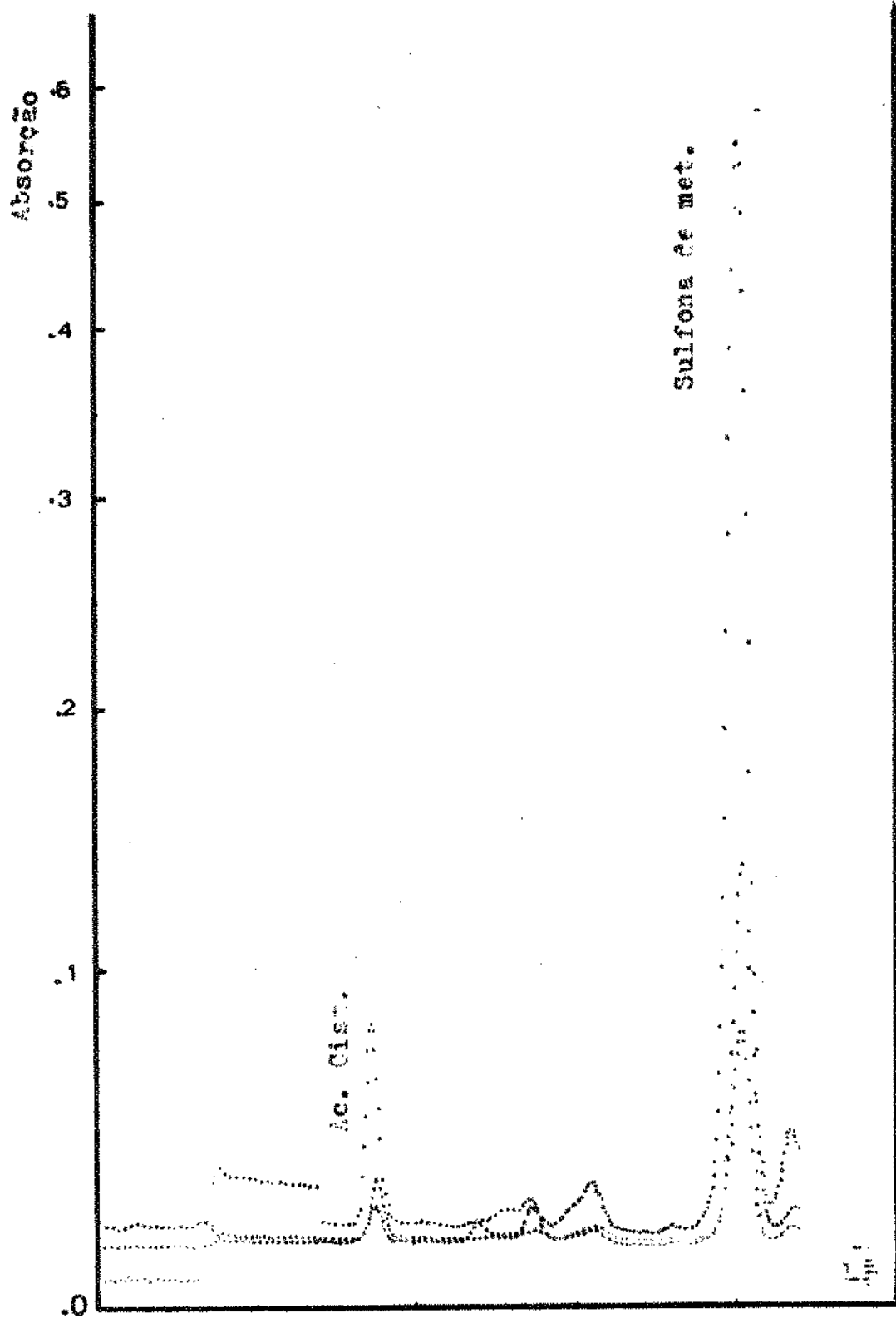


FIGURA 6: Cromatograma da separação de ac. cisteico e sulfona de metionina por analisador de aminoácidos (modelo Beckman 120 C).

TABELA 7: Determinação de metionina e cisteína total pelo método de oxidação com ácido perfórmico.

LINHAGEM	Concentração do aa sulfurado(mg/g prot.)	
	ác. cisteico	sulfona de metionina
Aeté I	1.95 ± 0.14	12.0 ± 0.17
Aeté II	1.90 ± 0.40	11.8 ± 0.72
Aroana	1.8 ± 0.30	11.7 ± 0.70
B.Ouro	1.8 ± 0.00	8.0 ± 0.00
C.Suja	1.7 ± 0.06	13.7 ± 0.90
Carioca	2.3 ± 0.07	10.1 ± 0.66
G.Precoce	2.6 ± 0.07	16.6 ± 0.54
Piratã I	1.9 ± 0.10	8.8 ± 0.06
Piratã II	1.6 ± 0.07	7.6 ± 0.55
SC 7010	1.5 ± 0.45	13.4 ± 0.54
SP 7052	1.6 ± 0.12	11.5 ± 0.41
Rosinha G <sub>2</sub>	1.4 ± 0.20	6.9 ± 0.00

TABELA 8: Metionina determinada segundo o método modificado de Tannenbaum e por oxidação total com ácido perfórmico

LINHAGENS	Met. por Tannenbaum	Met. por Oxidação	Met. Comple-xável
Aeté I	11.7±1.10	12.0±0.17	97.5
Aeté II	11.5±0.56	11.8±0.72	96.5
Aroana	11.2±0.56	11.7±0.70	95.7
B. Ouro	8.5±1.06	8.0±0.00	106.6
C. Suja	14.5±1.40	13.7±0.90	105.8
Carioca	10.5±0.00	10.1±0.66	103.8
G. Precoce	7.4±1.33	16.6±0.54	44.4
Piratã I	6.7±0.99	8.8±0.06	76.1
Piratã II	6.3±1.02	7.6±0.55	82.4
SC 7010	5.2±0.28	13.4±0.54	38.8
SP 7052	4.6±0.79	11.5±0.41	39.8
Rosinha G2	4.8±0.28	6.9±0.00	69.6

Met. (mg/g prot.)

Met. complexável (porcentagem)

TABELA 9: Média de "metionina complexável" (mg/g proteína) durante o armazenamento (dias)

Amostras	0	60 dias	150 dias	240 dias
Aeté I	11.7 ± 1.10	6.9 ± 0.14 (59)	5.7 ± 0.37 (49)	3.9 ± 0.10 (33)
Aeté II	11.5 ± 0.56	6.1 ± 0.08 (53)	4.0 ± 0.34 (35)	3.7 ± 0.05 (32)
Arcana	11.2 ± 0.56	8.0 ± 1.73 (71)	5.3 ± 0.33 (47)	3.6 ± 0.00 (32)
B. Ouro	8.5 ± 1.06	4.9 ± 0.37 (58)	3.0 ± 0.29 (35)	1.8 ± 0.05 (21)
C. Suja	14.5 ± 1.40	9.6 ± 0.12 (66)	5.8 ± 0.29 (40)	5.6 ± 0.76 (39)
Carioca	10.5 ± 0.00	4.7 ± 0.43 (45)	3.3 ± 0.00 (31)	3.5 ± 0.10 (33)
G. Precoce	7.4 ± 1.33	6.4 ± 0.70 (86)	7.7 ± 0.28(104)	3.6 ± 0.20 (49)
Piratã I	6.7 ± 0.99	5.3 ± 0.24 (79)	5.3 ± 0.25 (79)	4.9 ± 0.33 (73)
Piratã II	6.3 ± 1.02	5.0 ± 0.00 (79)	5.0 ± 0.41 (79)	5.3 ± 0.20 (84)
SC 7010	6.1 ± 0.28	5.2 ± 0.62 (85)	1.5 ± 0.10 (25)	1.9 ± 0.14 (31)
SP 7052	4.6 ± 0.79	4.3 ± 0.22 (93)	4.4 ± 0.00 (96)	1.9 ± 0.13 (41)
Rosinha	4.8 ± 0.28	5.3 ± 0.15(110)	1.1 ± 0.22 (23)	0.9 ± 0.13 (19)

( ) Porcentagem de "metionina complexável" em relação ao total inicial.

#### 4.4.2. Avaliação Estatística da Variação de Metionina Complexável nas Doze Variedades de Feijão.

Em alguns casos não foi possível afirmar se as perdas de metionina eram significativas, ou se dentre as variedades existiam diferenças no comportamento durante a estocagem, sendo aplicada uma análise de variância em função das linhagens, dos diversos tempos de estocagem e as repetições de laboratório.

Os dados da Análise de Variância que aparecem na Tabela 10 foram obtidos por computador. Para esta análise considerou-se como tratamento as doze variedades, como blocos os quatro tempos de armazenamento. Consideram-se as interações entre blocos e tratamentos e ainda o número de repetições de cada análise.

TABELA 10: Análise de Variância de "metionina complexável" de feijões (Variedades X Tempo)

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fe
Tratamentos	11	364.28	33.12	90.54
Blocos	3	550.21	183.40	501.42
Interações	33	257.77	7.81	21.36
Repetições	2	2.53	1.27	3.46
Resíduo	94	34.38	0.37	
Total	143	1209.18		

Desta Tabela chega-se a conclusão que há diferenças significativas entre os tratamentos, ou seja a quantidade de metionina quimicamente disponível em qualquer ponto da estocagem difere significativamente de uma linhagem para outra. Também entre blocos, ou tempos de armazenamento, existe uma diferença significativa a nível de 1%. No entanto as diferenças entre as repetições das determinações químicas para uma mesma variedade não são significativas dentro de cada tempo de estocagem.

Isto indica que o procedimento é satisfatório e que as diferenças encontradas são devidas a erro experimental. O erro total do experimento é dado por:

$$\text{C.V.} = \sqrt{\frac{\text{QM erro}}{\bar{x}}} \cdot 100$$

QM erro = quadrado médio do erro

$\bar{x}$  = média de todas as determinações

Neste trabalho o erro total do experimento é 10.88%, valor este que está dentro dos limites de aceitação de um método químico que deve ter no máximo 12% de erro.

Para verificar qual o melhor tratamento, ou melhor, qual a variedade que melhor suportou os oito meses de armazenamento, empregou-se o Teste de Tukey. Este teste é aplicado para comparar qualquer contraste entre duas médias, e é exato quando o número de repetições é o mesmo para todos os tratamentos.

O Teste de Tukey aplicado às doze variedades, em quatro tempos de armazenamento, com três repetições para cada um resultou numa ordenação que foi chamada de "capacidade".

19) Cara Suja foi a variedade de maior capacidade de estocagem. No início foi esta variedade que apresentou maior porcentagem de metionina complexável (em torno de 100%) terminando o período de armazenamento com uma porcentagem de metionina complexável relativamente alta (38%).

29) Aeté I, que não difere de Aeté II, Aroana, e Goiano Precoce.

39) Aroana, que não difere de Aeté II, Aeté I e Goiano Precoce.

49) Aeté II, que não difere de Aeté I, Aroana, Goiano Precoce, Piratã I e Piratã II.

59) Goiano Precoce, que não difere de Aeté I, Aeté II, Aroana, Carioca, Piratã I e Piratã II.

69) Piratã I, que não difere de Aeté II, Carioca, Goiano Precoce e Piratã II.

79) Carioca, que não difere de Aeté II, Bico de Ouro, Goiano Precoce, Piratã I e Piratã II.

89) Piratã II, que não difere de Aeté II, Bico de



Ouro, Goiano Precoce e Piratã I.

99) Bico de Ouro, que não difere de Carioca, SC 7010, SP 7052, mas é melhor que Rosinha G<sub>2</sub>.

109) SC 7010 e SP 7052, que não diferem de Bico de Ouro.

119) Rosinha G<sub>2</sub> foi o pior de todos. Esta variedade já apresentou antes do armazenamento um teor de metionina quimicamente disponível baixo (4.8 mg/g de proteína ou seja 69% do total).

Todavia, as variedades Piratã II e Piratã I foram as que apresentaram maior estabilidade a estocagem, como pode ser visto na Tabela 9. A "metionina complexável" nestas duas variedades abaixou para 84 e 73% respectivamente, da quantidade de metionina complexável inicial. Imediatamente inferior a estas foi Goiano Precoce que ao final dos oito meses perdeu 51% de sua "metionina complexável".

Como era de se esperar pela simples observação de dados, o teste de médias das linhagens e variedades indicou que o menor tempo de armazenamento foi o melhor e que a perda de "metionina complexável" foi maior quanto maior o tempo de estocagem.

Estes resultados vêm confirmar o trabalho de Durigan (1979), no qual a disponibilidade biológica de metionina (e, conseqüentemente, o valor biológico da proteína) diminui progressivamente durante um tempo de estocagem de oito

meses. Nessa pesquisa, não foi possível detectar a mudança do nível de metionina pela reação do ferricianeto de sódio, se gundo o procedimento de Lunder (1973).

Experiências futuras com animais de laboratório pod rão confirmar ou rejeitar a hipótese de que a metionina biolô- gicamente disponível é aquela que tem a capacidade de se com - plexar com o ferricianeto de sódio nas condições definidas. É importante ressaltar que a classe de fonte proteica, neste caso o feijão, pode influir no tipo de alteração química que conduz a "perda do aminoácido sulfurado".

## 5. CONCLUSÕES

5.1. Introduzindo algumas modificações nos procedimentos já existentes, é possível empregar o reagente clássico de McCarthy e Sullivan (o ferricianeto de sódio) na determinação quantitativa da metionina complexável presente em grãos de feijões.

5.2. Houve variação considerável do nível de metionina total entre as diversas linhagens e cultivares selecionados para este estudo. No feijão fresco, quase a totalidade da metionina esta na forma reduzida, e provavelmente aproveitável sob o ponto de vista nutricional, como foi evidenciado pela fração do aminoácido complexável com o ferricianeto em nove das doze linhagens.

5.3. Foi observada uma diminuição da quantidade de metionina quimicamente disponível em função do tempo de estocagem dos grãos de todos os cultivares e linhagens, diminuição esta que foi interpretada como degradação da metionina.

5.4. Considerando as quantidades absolutas de metionina em todos os feijões, a variedade "Cara Suja" foi a de maior

capacidade de estocagem, embora as variedades mais estáveis foram Piratã II e Piratã I, respectivamente.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. AKESON, W., STAHMANN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutrition, 83: 257-261, 1967.
2. A.O.A.C. Official methods of analysis of the association of Official Analytical Chemists. 11ed. Washington, A.O.A.C., 1970 1015p.
3. BELITZ, H.D., BOUVARD, F. Proteinase inhibitors from Phaseolus especies. Sultan J., 150 (4) : 216-220, 1972. (In: Chemical Abstracts, 1973).
4. BRESSANI, R., FLORES, M., ELIAS, L.G. Acceptability and presented of Food Legumes in the human diet. In: Papers presented in Seminar on Potentials of field beans and other food legumes in Latin American, Series Seminar, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali - Colômbia, nº 25, 1973 388p.
5. BRESSANI, R., ELIAS, L.G. MOLINA, M.R. Protein digestibility of some legume foods. Arch. Latinoam. Nutr.,

27 (2): 215-231, 1977.

6. CIRILLI, G. et al. Chemical characteristics of some varieties of though poods. Industrie Alimentari, 13 (5): 98-104, 1974. (In: Chemical Abstracts, 1975).
7. CONCON, J.M. The Chemical determination of critical aminoacids in cereal grains and other Foods and Feeds. Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds, Marcel Dekker, Mendel Friedman, ed. New York - vol. I: 341-346, 1975.
8. DURIGAN, J.F. Influência do tempo e das condições de estocagem sobre as propriedades química, físico-mecânicas e nutricionais do feijão mulatinho (*Phaseolus vulgaris*, L). 1979 69p; Tese (Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola UNICAMP.
9. ELIAS, L.G., BRESSANI, R., FLORES, M. Problems and potential in Storage and Processing of Food Legumes in Latin America. Paper presented in Seminar on Potential of field beans and other foods legumes in Latin America, Series Seminar, Centro International de Agricultura Tropical, Cali - Colombia, nº 25 1973 388p.

10. EVANS, R.J., BANDENER, S.L. Nutritive value of legume seed proteins. J. Agr. Food Chem., 15 (3): 439-443, 1967.
11. EVANS, I.M. et al. Comparison of Chemical and Microbiological Methods in the estimation of methionine in cowpea (Vigna unguiculata) seeds. Br. J. Nutr., (36): 289-293, 1976.
12. EVANS, R.J., BAUER, D.H. Studies of the poor utilization by rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (Phaseolus vulgaris). J. Agr. Food Chem., 26 (4): 779-784, 1978.
13. GJOEN, A.U., NJAA, L.R. Methionine sulphoxide as source of sulphur containing aminoacid for the young rat. Br. J. Nutr. (37): 93-105, 1977.
14. GRANGE, A., MIEGE, M.N., MIEGE, J. Changes in bean seed proteins in relation to seed maturation and storage conditions. Schweiz. Bot. Ges., 83 (1): 42-53, 1973. (In: Chemical Abstracts, 1974).
15. GEHRKE, C.W., NEUNER, T.E. Automated Chemical Determination of methionine. Journal of the Ass. Of. Analyt. Chem., 57 (3): 682-688, 1974.

16. GREENSTEIN, J.P. WINITZ, M. Methionine In: Chemistry of Amino Acids. John Willy and Sons, Inc. New York, 1961. p. 2125-2155.
17. GROSS, E. The Cyanogen Bromide reaction. Methods in Enzymology. C.H.W. Hirs (Ed), New York, Academic Press, 11: 238, 1967.
18. HALL, C.W. Drying Farm Crops, Consulting Associates, Inc, Edwards Brothers, Inc. An Arbor, MI, USA 34, 1957.
19. HANNAH, L.C., RHODES, B.B., EVANS, M. Examination and modification of the use of Leuconostoc mesenteroides of the sulphur containing amino acid from Vigna unguiculata. J. Agr. Food Chem., 25 (3): 620-623, 1977
20. HORN, M.J., JONES, D.B., BLUM, A.F. Colorimetric Determination of methionine in Proteins and Foods. J. of Biol. Chem., 166: 313-320, 1964.
21. JAFFÉ, W. Nutritional aspects of Common Beans and other Legumes Seeds as Animal and Human Foods., Caracas, Archivos Latinoamericanos de Nutrition, 1973. 325p.
22. JAFFÉ, J., BRUCHER, O. Total nitrogen and Sulphur



aminoacid in different lines of beans (Phaseolus vulgaris).  
Arch. Lat. Am. Nutri., 24 (1): 107-113, 1974.

23. JANJIC, V. Characteristics of aminoacid composition in some types and varieties of beans. Hrana Ishrana, 16 (7-8), 339-342, 1975. (In: Chemical Abstracts, 1976).
24. JAMALIAN, J., PELLET, P.L. Nutritional value of Middle Eastern foodstuffs, II Aminoacid Composition. J. Sci. Fd. Agric., 19: 378-382, 1968.
25. JOHNSON, P., SMILLIE, L.B. A proposed Structure for Streptomyces griseus Protease A. Bioch J., 130 (1): 36-37p, 1972.
26. KAKADE, M.L. Biochemical basis for differences in plant protein utilization. J. Agr. Fd. Chem., 22 (4): 550-555, 1974.
27. KAPOOR, H.C., SRIVASTAVA, V.K., GRIPTA, Y.G. Estimation of methionine in black-gram (Phaseolus mungo, Roxb), green-gram (Phaseolus aureus, Roxb) and soybean (Glycine max, L). Indian J. of Agric. Science, 42 (4) 296, 1972. (In: Chemical Abstracts, 1973).

28. KREMEM, D.M., VAUGHN, J.G. Rapid Screening Method for the Determination of sulphur containing aminoacid in mung bean hidrolyzates. B.B. Standal J. Amer. Dietetic Assoc., Aminoacids in Oriental Soybean Foods, 50: 397-400, 1967.
29. LIENER, I.E. Legume Toxins in relation to protein digestibility, A Review. J. Food Sci., 41 (5): 1076-1081, 1976.
30. LIPTON, S.H., BODWELL, C.E. Chemical Approaches for estimating Nutritionally available methionine. Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds, M. Friedman Assay Methods Biological Biochemical and Chemical. Marcel Dekker, New York I: 569-594, 1975.
31. LIPTON, S.H., BODWELL, C.E. Preparation and Chemical cleavage of S- phenacyl - L methionine sulfonium bromide. J. Agric. Fd. Chem., 24 (1): 32-37, 1976.
32. LIPTON, S.H., BODWELL, C.E. Specific Oxidation of Methionine Sulphoxide by Dimethyl Sulphoxide. J. Agri. Fd. Chem.,
33. LIPTON, S.H., BODWELL, C.E. A rapid method for deterting chemical alteration of methinine. J. Agr. Fd. Chem.,

25 (5): 1214-1216, 1977.

34. LITZENBERG, S.C. The improvement of Food Legumes as a contribution to improved Human Nutritional. In: Papers presented in Seminar on Potentials of field other food legumes in Latin America, series Seminar, n<sup>o</sup> 25, Cali-Colombia, Centro International de Agricultura Tropical, 1973. 388p.
35. LUNDER, T.L. An improved method for the determination of methionine in acid hidrolysates of Biological Products. Indrustrie Alimentarie, 12 (5): sp., 1973.
36. MANEEPUN, S., LUH, B.S., RUCKER, R.B. Aminoacid composition and Biological quality of lima bean protein. J. of Fd. Sc., 39 (1): 171-174, 1974.
37. McCARTHY, T.E., SULLIVAN, M.X. A new and highly specific colorimetric test for methionine. J. of Biol. Chem., 141: 871-876, 1941.
38. McCARTHY, T.E., PAILLE, M. A rapid determination of methionine in crude proteins. Biochem. and Biophys. Research Communications, 1 (1): 29-33, 1969.

39. MEINERS, C.R. et al. Proximate composition and yield of raw and mature dry legumes. J. Agr. Fd. Chem., 24 (6): 1122-1131, 1976.
40. MILLER, E.L., CARPENTER, K.J., MORGAN, C. Availability of sulphur aminoacid in protein foods. Br. J. of Nutr., (19): 249-267, 1965.
41. MILLER, E.L., CARPENTER, K.J., MILNER, C.K. Availability of sulphur aminoacid in protein foods - Chemical and nutritional changes in heated cod muscle. Br. J. Nutr., 19: 565-573, 1965.
42. MILLER, E.L., HARTLEY, A.W. THOMAS, D.C. Availability of sulphur aminoacid in protein foods - Effect of heat treatment upon the total aminoacid content of cod muscle. Br. J. Nutr., 19: 565-573, 1965.
43. MITCHELL, H.H., BEADLES, J.R. The effect of storage on the nutritional qualities of proteins of wheat, corn and soybeans. J. nutrition, 39: 463-484, 1949.
44. MOLINA, M.R., LA FUENTE, G., BRESSANI, R. Interrelaciones entre tiempo de remojo, tiempo de coccion, valor nutritivo y otras características del frijol. Arch. Latino-Am.Nutr.,

(24): 469-483, 1974.

45. MOLINA, M.R., LA FUENTE, G., BRESSANI, R.

Interrelationships between storage soaking time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black beans (Phaseolus vulgaris). J. of Fd. Sc., 40: 587-591, 1975.

46. MOLINA, M.R. BATEN, M.A., KING, K.W., BRESSANI, R. Heat treatment: a process to control the development of the hard-to-cook phenomenon in black beans (Phaseolus vulgaris). J. of Fd. Sc., 41: 661-666, 1971.

47. MORAES, R.M., ANGELUCCI, E. Chemical composition and aminoacid contents of Brazilian Beans (Phaseolus vulgaris). J. of Fd. Sc. 36 (3): 493-494, 1971.

48. MOREIRA, M.A., BRUNE, W., BATISTA, C.M. Avaliação do teor de metionina em sementes de feijão. Revista Interm. de Cienc, Agr. 26 (3): 225-231, 1976.

49. MORRIS, H.J., WOOD, E.R. Influence of moisture content on Keeping quality of dry beans. Fd. Tech., 10 (5): 225-228, 1956.

50. NJAA, L.R. Utilization of methionine sulphoxide by the young rat. Br. J. Nutr., 16: 571-576, 1962.
51. NJIKE, M.C., MBA, A.U. OYENUGA, V.A. Chick bioassay of available methionine and methionine plus cysteine. Development of assay procedure. J. Sc. Food Agr., 26: 175-187, 1975.
52. NJIKE, M.C., MBA, A.U., OYENUGA, V.A. Chick bioassay of available methionine and methionine plus cysteine assay of whole egg, fish, meal and casein, J. Sci. Fd. Agric., 26: 797-806, 1975.
53. NJIKE, M.C., MBA, A.U. OYENUGA, V.A. Chick bioassay of available methionine and sulphur amino acid assay of African oil bean meal (Pentaclethra macrophylla, Benth), conophor seed meal (Tetracarpidium conophorum, Hutch) and groundnut meals (Arachi hypogaeae, Linn). 26: 807-814, 1975.
54. OLEDZKA, R., KRAWCZYK, L.A. Enzymic digestion of vegetable protein. Roczniki Panstwowego Higieny, 24 (4): 456-464, 1973. (In: Chemical Abstracts, 1974).
55. PIENIAZERK, D. RAKOWSKA, M., KUNACHOWICZ, H. The

participation of methionine and cysteine in formation of bonds resistant to the action of proteolytic enzymes in heated casein. Br. J. Nutr., (34): 163-173, 1975.

56. PAWLIK, J. Use of enzymic hidrolisis with papain for the determination of methionine en some biological materials. Chemia Analiticyna (Warsaw) 18 (5): 963-967, 1973.
57. PIENIAZERK, D., RAKOWSKA, W.S., GRABAREK, Z. Estimation of available methionine and cysteine in proteins of food products by in vivo and in vitro methods. Br. J. Nutr., (34): 175-191, 1975.
58. PIENIAZERK, D., GRABAREK, Z., RAWOWSKA, A.M. Quantitative determination of contene of available methionine and cysteine in food proteins. Nutr. and Met., 18 (1): 16-22, 1975.
59. ROCKLAND, L.B. Saturated Salt Solutions for Static control of relative himidity between 5° and 40°. Anal. Chem., 32 (10): 1375-1376, 1960.
60. ROMERO, J., RYAN, D. Susceptibility of the major storage protein of bean (Phaseolus vulgaris, L), to in vitro enzymatic hidrolisis. J. Agr. Fd. Chem., 26 (4):

784-791, 1978.

61. SAYANOVA, V.V., SUMENKOVA, V.V., Aminoacid composition of homogeneous bean seed proteins. Izv. Akad. Nauk Mold. SSR, Ser. (5): 23-28, 1977.
62. SCAMPARINI, A.R.P. Demetoxilação de pectina cítrica. 1978 Tese (Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola UNICAMP. 78 p.
63. SHECHTER, Y., BURSTEIN, Y., PATCHORNICK, A. Seletive oxidation of methionine residues in proteins. Biochemistry, 14 (20): 497-503, 1975.
64. SILVA, V.R., IACHAN, A. Proteínas de variedades brasileiras de feijão (Phaseolus vulgaris, L). Rev. Bras. de Tecn., 6 (2): 143-150, 1975.
65. SAID, A.K., HEGESTED, D.M. Evaluation of Dietary Protein Quality in Adult Rats. J. Nutrition, 99: 474-480, 1969.
66. SPIES, J.R. Determination of Tryptophan in proteins. Anal. Chem., 39: 1412-1415, 1967.
67. TEDERKO, A. Colorimetric determination of methionine in



- high protein food products. Roczniki Instytutu Przemysłu Miesnego, 9 (2): 91-96, 1972.  
(In: Chemical Abstracts, 1972).
68. TANNENBAUM, S.R., BARTH, H., LE ROUX, J.P. Loss of methionine in casein during storage with autoxidizing methyl linoleate. J. Agric. and Fd. Chem., 17 (6): 1353-1354, 1969.
69. YAMAGUCHI, N. Antioxidative activity of aminocompounds on fats and oils. I - Oxidation of methionine during course of autoxidation of linoleic acid. J. of Fd. Sci and Tech., 18 (7): 313-318, 1971.
70. WALKER, H.G. et al Problems in Analysis for sulphur aminoacid in feeds and foods. Protein Nutricional Quality of Foods and Feeds, Marcel Dekker, Mendel Friedman, ed. New York - Assay Methods Biological, Biochemical and Chemical, I: 549-561, 1975.
71. WHITE, A. HANDLER, P. SMITH, E.L. Princípios de Bioquímica. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.
72. ZUCAS, S.M., LOURENÇO, E.L., CAMPOS, M.A.P. Os feijões, valor nutritivo e substâncias indesejáveis. In: I Sim-

pósio Brasileiro do Feijão, 19, Campinas, 22 a 29 de agosto, 1971. Anais. Viçosa, Univ. Fed. de Viçosa, 1972.

Vol. 2 p. 539-570.