

ESTUDO DO VALOR NUTRICIONAL DA PROTEÍNA DE  
FEIJÃO-COMUM, (*Phaseolus vulgaris*, L.),  
FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*, L.), ERVILHA  
(*Pisum sativum*, L.) E GRÃO-DE-BICO (*Cicer  
arietinum*, L.) UTILIZANDO MARCAÇÃO  
COM NITROGÊNIO 15. *Domene*

20/90

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DO VALOR NUTRICIONAL DA PROTEÍNA DE  
FEIJÃO-COMUM, (*Phaseolus vulgaris*, L.), FEIJÃO-DE-CORDA  
(*Vigna unguiculata*, L.), ERVILHA (*Pisum sativum*, L.) E  
GRÃO-DE-BICO (*Cicer arietinum*, L.) UTILIZANDO MARCAÇÃO COM  
NITROGÊNIO 15.

Parecer

*Este exemplar corresponde a redação final da tese  
defendida por Semíramis Martins Álvares Domene  
e aprovada pela comissão julgadora em 27-12-90*  
Campinas, 27 de dezembro de 90.

SEMÍRAMIS MARTINS ÁLVARES DOMENE

NUTRICIONISTA



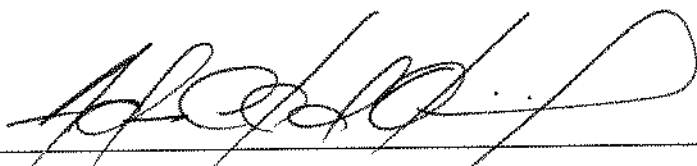
ORIENTADOR: PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA.†

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de  
Mestre em Ciência da Nutrição.

1990

B010100947

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira  
(orientador)



Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares  
(membro)



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri  
(membro)



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán  
(membro)

Campinas, 27 de Dezembro de 1990.

"Todo organismo possui uma, e apenas uma, necessidade central na vida - realizar suas potencialidades. A semente torna-se um carvalho, o filhote um cão, que se relaciona com o dono em amizade e lealdade, como convém aos de sua espécie; é só o que se pede de um carvalho e um cão. Mas a tarefa do ser humano em busca da plenitude de sua natureza é muito mais complexa, pois o homem deve agir com autoconsciência, isto é, sua evolução nunca é automática, mas deve ser até certo ponto escolhida e confirmada por ele próprio."

R. May.

Para meus pais e Cesar.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação competente e amiga.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pela cesão das sementes de feijão-de-corda.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas, e em especial aos Drs. Eduardo A. Bulisani e Nelson R. Braga, pela cesão das sementes de feijão-comum, ervilha e grão-de-bico.

Aos Profs. Drs. Paulo C. O. Trivelin e Reynaldo L. Victória, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, pela orientação e acompanhamento das fases de cultivo dos grãos e determinações de nitrogênio 15.

Ao Sr. João Salvador, pela atenção dispensada ao canteiro experimental.

Ao Pingin e ao Joãozinho, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela determinação do nitrogênio 15.

À colega e amiga Hilda R. Torin, pela confecção dos gráficos e pelo apoio.

À Liana e à Cristina, pelo apoio no trabalho de laboratório.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Gneri, do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Ciência da Computação, da Universidade Estadual de Campinas, pela revisão da análise estatística.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e à Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio financeiro.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelo fornecimento das cópias deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas que contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| ÍNDICE GERAL.....               | 8   |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....          | 11  |
| ÍNDICE DE TABELAS.....          | 14  |
| RESUMO.....                     | 17  |
| ABSTRACT.....                   | 20  |
| INTRODUÇÃO.....                 | 23  |
| REVISÃO DA LITERATURA.....      | 26  |
| MATERIAL E MÉTODOS.....         | 50  |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....     | 74  |
| CONCLUSÕES.....                 | 110 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 112 |
| ADENDO 1.....                   | 139 |
| ADENDO 2.....                   | 140 |

## ÍNDICE GERAL

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                          | 11 |
| ÍNDICE DE TABELAS.....                                                          | 14 |
| RESUMO.....                                                                     | 17 |
| ABSTRACT.....                                                                   | 20 |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                              | 23 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....                                                   | 26 |
| 2.1. Considerações sobre o uso de leguminosas para a<br>alimentação humana..... | 26 |
| 2.1.1. O processamento térmico.....                                             | 29 |
| 2.1.2. O feijão-comum.....                                                      | 30 |
| 2.1.3. O feijão-de-corda.....                                                   | 33 |
| 2.1.4. A ervilha.....                                                           | 35 |
| 2.1.5. O grão-de-bico.....                                                      | 37 |
| 2.2. Avaliação da qualidade protéica.....                                       | 39 |
| 2.2.1. O nitrogênio endógeno.....                                               | 45 |
| 2.2.2. O uso de isótopos.....                                                   | 50 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                      | 57 |
| 3.1. Material.....                                                              | 57 |

|          |                                                      |     |
|----------|------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.1.   | Fontes protéicas.....                                | 57  |
| 3.1.2.   | Animais.....                                         | 57  |
| 3.2.     | Métodos.....                                         | 58  |
| 3.2.1.   | Cultivo das sementes.....                            | 58  |
| 3.2.2.   | Determinações químicas.....                          | 63  |
| 3.2.2.1. | Nitrogênio.....                                      | 63  |
| 3.2.2.2. | Nitrogênio 15.....                                   | 63  |
| 3.2.2.3. | Aminoácidos.....                                     | 63  |
| 3.2.2.4. | Composição centesimal.....                           | 63  |
| 3.2.3.   | Ensaio biológicos.....                               | 64  |
| 3.2.3.1. | Preparo das fontes protéicas.....                    | 64  |
| 3.2.3.2. | Preparo das dietas.....                              | 66  |
| 3.2.3.3. | Determinação dos indicadores de qualidade protéica.. | 69  |
| 3.2.4.   | Tratamento estatístico.....                          | 70  |
| 4.       | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                          | 74  |
| 4.1.     | Cultivo e caracterização dos grãos.....              | 74  |
| 4.1.1.   | Dados de produção.....                               | 74  |
| 4.1.2.   | Composição centesimal.....                           | 76  |
| 4.1.3.   | Composição em aminoácidos.....                       | 78  |
| 4.2.     | Resultados obtidos dos ensaios biológicos.....       | 83  |
| 4.2.1    | Ingestão e retenção de nitrogênio.....               | 83  |
| 4.2.2.   | Excreção de nitrogênio total e de nitrogênio 15..... | 87  |
| 4.2.3.   | O nitrogênio de origem endógena.....                 | 90  |
| 4.2.4.   | Indicadores de qualidade protéica.....               | 101 |

|    |                                 |     |
|----|---------------------------------|-----|
| 5. | CONCLUSÕES.....                 | 110 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 112 |
|    | ADENDO 1.....                   | 139 |
|    | ADENDO 2.....                   | 140 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema simplificado do canteiro experimental e disposição das culturas..... 60
- Figura 2. Vista do canteiro experimental, aos 26 dias do plantio, e disposição das culturas: 1. feijão-de-corda, 2. grão-de-bico, 3. feijão-comum, 4. ervilha..... 61
- Figura 3. Vista do canteiro experimental, aos 42 dias do plantio, e disposição das culturas: 1. feijão-de-corda, 2. grão-de-bico, 3. feijão-comum, 4. ervilha..... 62
- Figura 4. Regressão linear obtida para ganho de peso em função da retenção de nitrogênio, para ratos Wistar alimentados com dietas contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico ou caseína como fonte protéica e dieta aprotéica, em balanço de nitrogênio de quatro dias após jejum e 48 horas de adaptação às dietas. Valores individuais por animal..... 86
- Figura 5. Excreção de nitrogênio fecal por dia para ratos Wistar alimentados com dietas contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda ou grão-de-bico como fonte protéica, durante

48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio.  
Valores médios para grupos de 6 ou 4 animais (grão-de-bico)..... 88

Figura 6. Excreção do isótopo nas fezes por dia, para ratos Wistar alimentados com dieta contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda ou grão-de-bico como fonte protéica, marcadas com  $^{15}\text{N}$ , durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço. Valores médios para grupos de 6 ou 4 animais (grão-de-bico).... 89

Figura 7. Regressão potencial para percentagem de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de ervilha como fonte protéica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupo de 6 animais, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio..... 95

Figura 8. Regressão potencial para quantidade de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de ervilha como fonte protéica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupo de 6 animais, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio..... 96

Figura 9. Regressão potencial para percentagem de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de feijão-de-corda como fonte protéica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupo de 6 animais,

durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de  
nitrogênio..... 97

Figura 10. Regressão potencial para quantidade de nitrogênio  
endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar  
alimentados com dieta de feijão-de-corda como fonte protéica,  
marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupo de 6 animais,  
durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de  
nitrogênio..... 98

Figura 11. Regressão potencial para percentagem de nitrogênio  
endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar  
alimentados com dieta de feijão-comum como fonte protéica,  
marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupo de 6 animais,  
durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de  
nitrogênio..... 99

Figura 12. Regressão potencial para quantidade de nitrogênio  
endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar  
alimentados com dieta de feijão-comum como fonte protéica,  
marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupo de 6 animais,  
durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de  
nitrogênio.....100

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Percentagens de                    em excesso dos grãos de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico, proporção empregada para mistura e percentagem de                    em excesso obtido nas dietas..... | 65 |
| Tabela 2. Formulação da mistura salina utilizada para o preparo das dietas.....                                                                                                                                                    | 67 |
| Tabela 3. Formulação da mistura vitamínica utilizada para o preparo das dietas.....                                                                                                                                                | 68 |
| Tabela 4. Formulação das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.....                                                                                                                                                             | 70 |
| Tabela 5. Distribuição dos animais por tratamento, segundo os pesos individuais, e valores médios e desvios padrão obtidos para cada tratamento. (Primeiro ensaio).....                                                            | 71 |
| Tabela 6. Distribuição dos animais por tratamento, segundo os pesos individuais, e valores médios e desvios padrão obtidos para cada tratamento. (Segundo ensaio).....                                                             | 71 |

Tabela 7. Períodos de germinação, floração e colheita dos grãos de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico, durante cultura para incorporação de nitrogênio 15. Registros em dias após plantio (D.A.P.) e dias após germinação (D.A.G.)..... 75

Tabela 8. Composição centesimal (g/100 g) das fontes protéicas ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico..... 79

Tabela 9. Composição em aminoácidos das fontes protéicas, ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, em g/16 g de nitrogênio, e escore químico..... 80

Tabela 10. Retenção de nitrogênio obtida por balanço de 4 dias após adaptação de 48 horas, com ratos Wistar previamente jejuados e alimentados com dieta contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico ou caseína como fonte protéica..... 84

Tabela 11. Nitrogênio de origem endógena excretado por ratos Wistar previamente jejuados e alimentados com dieta contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda ou grão-de-bico marcados com  $^{15}\text{N}$  como fonte protéica, durante balanço de 4 dias após adaptação de 48 horas..... 91

Tabela 12. Nitrogênio absorvido por ratos Wistar previamente jejuados e valores de Digestibilidade de proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e caseína obtidos em balanço de 4 dias após adaptação de 48 horas. Segundo ensaio..... 92

Tabela 13. Valores de Digestibilidade de proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, obtidos por balanço de nitrogênio de 4 dias após adaptação de 48 horas com ratos Wistar previamente jejuados.....102

Tabela 14. Valor Biológico de proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, obtido por balanço de nitrogênio de 4 dias após adaptação de 48 horas com ratos Wistar previamente jejuados.....103

Tabela 15. Valores de NPU para proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, obtidos por balanço de nitrogênio de 4 dias após adaptação de 48 horas, com ratos Wistar previamente jejuados.....104

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o valor nutricional da proteína de ervilha (*Pisum sativum*, L.), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L), feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*, L. Walp.) e grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L.), através do uso do nitrogênio 15 ( $^{15}\text{N}$ ) como marcador. Para que fosse incorporado à proteína, procedeu-se o plantio de sementes de cultivares puros dos grãos, em canteiro experimental que recebeu adubação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  enriquecido com 10,0 átomos de  $^{15}\text{N}$  por cento. A utilização de cultivares puros e a homogeneidade de tratos culturais permitiram a eliminação de variáveis como características genéticas e condições ambientais que interferem nos resultados de avaliação química e nutricional dos grãos.

As sementes obtidas foram analisadas quanto à composição centesimal e de aminoácidos, cozidas e liofilizadas, e o material obtido foi empregado como fonte protéica na formulação de dietas para ratos albinos Wistar, em ensaio randomizado. O grupo controle recebeu dieta contendo caseína comercial como fonte protéica, e outro grupo recebeu dieta aprotéica. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e ciclos de luz, submetidos a jejum de 24 horas seguido de um período de 48 horas para adaptação às dietas, com alimento e água ad libitum, em gaiolas de crescimento. Em seguida, foram transferidos para gaiolas metabólicas onde permaneceram por 4

dias, com coleta de fezes a cada 24 horas. Fez-se determinação de nitrogênio total bem como de  $^{15}\text{N}$  nas fezes produzidas durante o período de adaptação e nas fezes e urinas do período de balanço, bem como controle do ganho de peso e ingestão de dieta.

As determinações químicas mostraram que, dentre as leguminosas estudadas, o grão-de-bico apresenta teores de proteína bruta 25 % menores do que as demais, e cerca de 300 % mais lípidos totais. A composição em aminoácidos demonstrou que a ervilha apresenta o menor teor de sulfurados, resultando no mais baixo valor de escore químico.

Os resultados dos ensaios biológicos foram submetidos a Análise de Variância de uma via. Pôde-se estabelecer relação entre ganho de peso e retenção de nitrogênio expressa por regressão linear positiva e moderada, com coeficiente de correlação de 0,7616 ( $p < 0,01$ ). A expectativa de que o período de 48 horas subsequente ao jejum fosse suficiente para a adaptação dos animais às dietas foi confirmada pela estabilização dos níveis de excreção de nitrogênio endógeno, que apresentaram acelerada diminuição neste período e em seguida não diferiram durante o período de balanço ( $p < 0,05$ ), descrevendo uma regressão potencial negativa e forte, com coeficientes sempre superiores a 0,9500 ( $p < 0,01$ ). A quantificação do nitrogênio endógeno pela aplicação do isótopo demonstrou que os animais alimentados com dietas de leguminosas cozidas excretam cerca de 2 a 2,5 vezes mais material endógeno do que os animais em dieta aprotéica. Consequentemente, os indicadores de

qualidade protéica obtidos através da correção pelo uso do isótopo resultam em valores sempre superiores aqueles obtidos através da correção pela dieta aprotéica; apesar disto, nem sempre há diferença significativa entre os mesmos.

A análise dos indicadores destaca o desempenho do feijão-de-corda, que apresenta os melhores valores de Digestibilidade, Valor Biológico e Utilização Líquida da Proteína.

## ABSTRACT

The aim of this work was to study the value of the protein of the pea (*Pisum sativum*, L.), the common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.), the cow pea (*Vigna unguiculata*, L. Walp.) and the chick pea (*Cicer arietinum*, L), by the way of the use of nitrogen 15 ( $^{15}\text{N}$ ) as a tracer. In order to be incorporated to the protein, seeds from pure varieties of grains were planted in experimental patches wich received fertilizing of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  enriched with 10,0 atoms of  $^{15}\text{N}$  %. The use of pure varieties and the homogeneity of the culture treatment made it possible to eliminate variables such as genetical characteristics and environmental conditions wich interfered in the results of the chemical and nutritional valuation of the grains.

The seeds wich were obtained were analised in relation to the proximate composition and of amino acids, cooked and freeze dried and the material obtained was used as a source of protein in the composition of diets for albino Wistar rats in a randomized assay. The control group received a diet containing commercial casein as a source of protein and another group received a diet without protein. The animals were mantained in controlled conditions of temperature and cycles of light, submitted to a 24 hour fasting and followed by a 48 hour period to get adapted to the diets, with food and water *ad libitum* in growth cages. Right after, they were transfered to metabolic

cages where they remained for 4 days, with feces collect at each 24 hours. A determination of total nitrogen and  $^{15}\text{N}$  was made in the feces from the both periods and in the urine obtained in the balance period, as well as the control of weight gain and the ingestion of diet.

The chemical determinations showed that among the studied leguminous, the chick pea presented content of crude protein 25% lower than the others and around 300% more total lipids. The composition of amino acids showed that the pea presented the least content of sulphur containing ones, resulting in the lowest value of chemical score.

The results of the biological assays were submitted to one way analisys of variance (ANOVA). It was possible to estabilish a relation between the weight gain and the retention of nitrogen expressed by positive and moderate linear regression, with a correlation coefficient of 0,7616 ( $p < 0,01$ ). The presumption that the period of 48 hours following the fasting would be enough for the adaptation of the animals to the diets was confirmed by the stabilization of the levels of excretion of endogenous nitrogen wich presented an acelereted decrease in this period and after did not differ during the balance period ( $p < 0,05$ ), showing a strong and negative potential regression with coefficients always over 0,9500 ( $p < 0,01$ ). The quantification of endogenous nitrogen by applying the isotope showed that the animals fed with cooked leguminous diets excreted around 2 to 2,5 times more endogenous material than the animals on diets without protein. Consequently, the indicators

of protein quality obtained through the correction by the use of isotope, resulted in values always superior to those obtained by the correction of diet without protein; nevertheless, not always are there significant differences among them.

The analysis of indicators point out the performance of the cow pea which presented the best values of digestibility, biological value and net protein utilization.

## 1. INTRODUÇÃO

As leguminosas representam importante fonte de proteína para a dieta de muitos povos, com destaque para países não desenvolvidos, onde o poder aquisitivo dos cidadãos é determinante para o grande contingente de famintos.

O interesse por fontes alimentares que forneçam proteína a custos acessíveis às camadas mais humildes da população é um importante estímulo ao estudo deste grupo de vegetais, que apresentam como uma de suas características comuns teores protéicos da ordem de 20 %. É interessante notar que nos diferentes pontos do globo o consumo de determinadas leguminosas é parte do hábito regional, fazendo das preparações que compõem representantes da cultura local. Tal é o caso da ervilha em países Asiáticos (MANAN et alii, 1987), do feijão-comum e do feijão-de-corda em países da América Latina e África (KELLY & BLISS, 1975; DEL ROSARIO et alii, 1981; SGARBIERI & WHITAKER, 1982) e do grão-de-bico, na Índia (CHAVAN et alii, 1986). Estas leguminosas são, hoje, as mais produzidas para consumo em espécie no mundo.

O uso de indicadores de qualidade protéica obtidos através de ensaios de balanço de nitrogênio ou de crescimento, aliados à caracterização química dos alimentos, são procedimentos bastante difundidos entre a comunidade científica internacional que dedica-se ao estudo da nutrição desde o início deste século. Já após a divulgação dos primeiros resultados que

aplicavam estes indicadores para avaliar diferentes proteínas, foram conhecidos os trabalhos que utilizavam isótopos, o que trouxe uma nova fronteira à investigação dos mecanismos envolvidos nos processos de digestão, absorção e metabolização de nutrientes. Para isto contribuíram decisivamente os trabalhos de Schoenheimer e Rittenberg, na década de 30, que estabeleceram os primeiros conceitos acerca da dinâmica envolvida nestes processos. A ampliação do conhecimento sobre a aplicação de isótopos estáveis, aliada ao desenvolvimento tecnológico que criou acesso a formas alternativas de marcação e refinamento dos métodos analíticos, permitiu que hoje se possa determinar a contribuição nutricional de um alimento não apenas tendo-se em conta sua ingestão e eliminação, mas considerando aspectos de seu metabolismo de forma inócua e não invasiva. A possibilidade de aplicação de métodos com estas características tende a reforçar padrões éticos de investigação.

A avaliação nutricional de leguminosas através de ensaios biológicos foi sempre limitada pela interferência de acentuada eliminação de material endógeno nas fezes e urinas dos animais experimentais, sendo este fato mais marcante para grãos crus, mas também presente para grãos cozidos, conforme demonstrado por diferentes autores principalmente na última década (BENDER & MOHAMMADIHA, 1981; FAIRWEATHER-TAIT et alii, 1983; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a e 1986b).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar nutricionalmente a proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico através do uso do nitrogênio  $^{15}$

como marcador, por ensaio de balanço de nitrogênio, com o estabelecimento de sua composição centesimal e de aminoácidos como informações auxiliares.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Considerações sobre o uso de leguminosas para a alimentação humana.

As leguminosas, e em especial os feijões, são alimentos cujo consumo destaca-se em países em desenvolvimento (JAFFÉ, 1986; BIRENDER et alii, 1987; OMUETI & SINGH, 1987). Além de determinantes econômicos, existem também fatores culturais que explicam a popularidade das leguminosas na dieta destes povos. Na Índia, existem seis ou sete variedades de importância econômica (ESH et alii, 1959); na Nigéria, o caupi (*Vigna unguiculata*) é a leguminosa mais consumida (OGUN et alii, 1989). O gênero *Phaseolus* é o mais difundido no Brasil, enquanto o gênero *Pisum* é bastante popular no Oriente Médio (SGARBIERI & WHITAKER, 1982). Segundo De Araújo e Watt (1982), o consumo de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) combinados com milho e arroz é responsável por 50% da proteína ingerida pela população rural do nordeste brasileiro. Destaca-se a importância do feijão-de-corda no Rio Grande do Norte, onde é a principal cultura de subsistência (RÊGO NETO et alii, 1982).

O levantamento anual da Organização de Alimentos e Agricultura (F.A.O. ou "Food and Agricultural Organization"), mostra que em 1986 a produção mundial de grãos foi de 55.200 toneladas métricas (MT), das quais 14.750 (26,72%) de feijões e

14.313 (25,93%) de ervilha, representando respectivamente o terceiro e quarto grupo de leguminosas mais produzido, apenas precedidos pela soja e pelo amendoim, cuja produção é computada separadamente do grupo "grãos".

O importante teor protéico das leguminosas, aliado à sua já referida popularidade, levou muitos pesquisadores a dedicarem seus estudos ao conhecimento das propriedades nutricionais destes grãos, visando incrementar o correto emprego de uma fonte protéica de baixo custo para a alimentação humana.

A procura por cultivares que aliassem características como alta capacidade produtiva e mais alto valor nutricional à resistência a patógenos gerou programas de melhoramento genético de leguminosas em várias partes do mundo. O volume de trabalhos estudando um mesmo cultivar permite observar a grande variabilidade entre os resultados de determinações químicas e avaliações biológicas. Reichert e MacKenzie (1982), analisando a composição de 198 amostras de "*Pisum sativum*" cv. Trapper, encontraram teores de proteína de 12 a 28 %, com um conteúdo médio de 20,7%. Estes dados levaram os autores a sugerir que sejam definidas as condições agronômicas de produção de grãos para estudos de avaliação nutricional. Em outro trabalho, Esh e colaboradores (1959) estudando 100 amostras de cultivares puros de nove variedades de leguminosas produzidas na Índia encontrou variações no teor protéico que alcançavam 60%, segundo a região de origem. Estes exemplos ilustram o fato de que fatores como clima, natureza do solo, tipo e quantidade de fertilizante, resultam em diferenças de

composição química (ESH et alii, 1959; SINGH et alii, 1983) que podem interferir diretamente nos resultados de avaliação nutricional dos grãos. A influência destes fatores pode ser mais importante sobre as características químicas de feijões do que aqueles decorrentes de variedades ou épocas de plantio (LANTZ et alii, 1958).

Vale considerar que os trabalhos em sua maioria consideram o teor de proteína bruta ( $N \times 6,25$ ) e desde que as leguminosas apresentam considerável fração de nitrogênio não protéico (DEL ROSARIO et alii, 1981; GUEGUEN & BARBOT, 1988), os valores obtidos em geral superestimam o teor real. Contudo, apesar do elevado teor, sua proteína apresenta quantidades pequenas de aminoácidos sulfurados, metionina, cistina e cisteína (EVANS & BOULTER, 1980; SGARBIERI et alii, 1980; DEL ROSÁRIO et alii, 1981; REICHERT & MACKENZIE, 1982; SELIGSON & MACKEY, 1984; KOCHHAR et alii, 1988; KEITH & BELL, 1988) e melhores teores de lisina. Assim, ao considerarmos o padrão de aminoácidos que atende ao requerimento humano, nota-se um dos fatores responsáveis pelo limitado valor nutricional das leguminosas como fonte protéica, para o que também contribui a baixa biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados nestes vegetais (SGARBIERI et alii, 1979). Além desta, outras características comuns a esta família de vegetais interferem negativamente em seu uso como alimento. Tal é o caso de fatores antinutricionais (inibidores de proteases, de alfa-amilase e a presença de oligossacárides não digeríveis e proteínas tóxicas, lectinas) (BRESSANI & ELIAS, 1977; SGARBIERI & WHITAKER, 1982).

Contudo, o tratamento doméstico necessário para a cocção dos grãos para consumo é responsável por significativa diminuição dos efeitos negativos destes compostos (PION et alii, 1979; SGARBIERI & WHITAKER, 1982; OGUN et alii, 1989).

Apesar da evolução da tecnologia na área de alimentos, que permite hoje o acesso a alimentos prontos para o uso, o consumo de leguminosas in natura é bastante expressivo; em muitos países a combinação destes grãos com cereais resistiu ao tempo e responde por significativa parcela do aporte protéico diário (JAFFÉ, 1973).

#### 2.1.1. O processamento térmico.

O tratamento térmico visa inicialmente melhorar seus atributos sensoriais, mas traz também como consequência alterações nutricionais. A cocção pode contribuir negativamente, à medida em que é responsável pela destruição de alguns nutrientes e pela diminuição da biodisponibilidade de outros (MELNICK & OSER, 1949; PION et alii, 1979; GEERVANI & THEOPHILUS, 1980).

Alguns trabalhos discutem a influência do processamento de leguminosas prévio à cocção. Este processamento inclui, além da seleção e higienização dos grãos, diferentes tempos de maceração (remolho) e, para determinados tipos de leguminosas, como o grão-de-bico, a retirada da casca (SINGH, K. et alii, 1988) o que normalmente é feito no ambiente domiciliar para diminuir o tempo de cocção. Dentre os vários procedimentos, a maceração seguida de cocção sob pressão são os mais comuns, e

as condições ótimas de processamento variam com a espécie da leguminosa (BRESSANI & ELIAS, 1977; SINGH et alii, 1988). O processo de maceração contribui para a melhoria do desempenho nutricional das leguminosas, permitindo que uma percentagem do ácido fítico presente nos grãos seja hidrolisado (MANAN et alii, 1987), mas o efeito do descasque parece ser mais benéfico, por diminuir expressivamente os teores de taninos e de estaquiose (OGUN et alii, 1989).

A fim de proceder a avaliação do alimento na forma como é normalmente consumido, muitos pesquisadores aplicam tratamento térmico para estudo do valor nutricional de leguminosas, empregando autoclavagem (SARWAR & PEACE, 1986) ou cocção (EVANS & BAUER, 1978; GEERVANI & THEOPHILUS, 1980; MANAN et alii, 1987).

#### 2.1.2. O feijão-comum.

Dentre as leguminosas consumidas pelo homem, o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) é, sem dúvida, uma das mais amplamente estudadas. Vale destacar o incremento à pesquisa de seu valor nutricional a partir da década de 1970, para o que contribuíram os encontros do Instituto de Nutrição da América Central e Panamá (INCAP) com o tema "Recursos Proteínicos en America Latina" (1971) na Guatemala, do Protein Advisory Group (1972) em Roma e do "International Center of Tropical Agriculture" (1973) na Colômbia.

Sua origem está estimada em 7000 anos, na região atualmente ocupada pelos países da América Central (KAPLAN,

1965) e atualmente é consumido em várias partes do mundo (DUTRA DE OLIVEIRA, 1973).

Vários trabalhos foram conduzidos com vistas a determinar sua composição centesimal bem como caracterizar física, química e nutricionalmente sua proteína e frações protéicas, além de estabelecer sua constituição em aminoácidos e a biodisponibilidade dos mesmos, principalmente dos sulfurados. Sgarbieri (1980) em artigo sobre características das proteínas de várias leguminosas, refere um teor de 25,0 e 25,5% de proteína bruta (expressa em base seca, b.s.) para dois cultivares de *Phaseolus vulgaris*. O mesmo autor em outro artigo com colaboradores (1979), apresenta valores de 23,37 a 25,77% de proteína bruta, para três outros cultivares. A literatura traz valores de até 35,3% (b.s.) (EVANS & BOULTER, 1980). Em relação à sua composição em aminoácidos, existe consenso quanto à limitação em sulfurados. Foram encontrados teores de metionina de 0,87 a 1,32 g/16 g N e de cistina de 0,41 a 0,86 g/ 16 g N em quatro cultivares por Kelly e Bliss (1975). Em um compilamento de 100 linhagens puras, Jaffé e Brucher (1974) informam um teor médio de 1,12 g/16 g N para metionina e de 0,98 g/16 g N para cistina . Estes dados são pouco inferiores aos encontrados por Sgarbieri e colaboradores (1979), que informa concentrações de 1,13 a 1,42 g/16 g N para metionina e de 1,11 a 1,51 g/16 g N para cistina, determinados em 4 cultivares de feijão-comum. O baixo teor de sulfurados ainda não diz tudo sobre o valor nutricional da proteína de feijão-comum. A biodisponibilidade da metionina está estimada

em 29,3 a 40,65% (SGARBIERI et alii, 1979) o que contribui negativamente para seu aproveitamento. Conclusivamente, sabe-se que o teor de metionina é determinado por fatores genéticos e o cruzamento de linhagens pode contribuir para sua diminuição (KELLY, 1971 apud JAFFÉ & BRUCHER, 1974). Outras informações sobre a avaliação biológica do feijão-comum demonstram baixos valores de digestibilidade, sejam determinados in vitro ou in vivo. Assim, o feijão cozido apresenta digestibilidade aparente de 57,1 a 73,4%, sendo esta variação atribuída a uma relação direta e positiva com o aumento da ingestão de nitrogênio (BRESSANI et alii, 1976). In vitro, os valores de digestibilidade são de 60,5 a 65,5%, conforme demonstrado por Sgarbieri e colaboradores (1979) que trabalhou com quatro cultivares.

O feijão Aroana 80, estudado neste trabalho, é o resultado da seleção individual em F5 do segundo retrocruzamento de (Aroana x Cornell) e Aroana, realizada na Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Esta cultivar apresenta sementes oblongas marrom avermelhadas e halo de cor intensa, podendo ser enquadrado no grupo "chumbinho" (POMPEU, 1982).

#### 2.1.3. O feijão-de-corda.

O feijão-de-corda é uma cultura cuja aplicação principal refere-se ao seu consumo na região de produção, com destaque para o Nordeste do Brasil, onde até 78% do que é produzido é

consumido no próprio meio rural. Com estas características e considerando as condições agriculturáveis desta região do Brasil, a produtividade é baixa ( em média de 295 Kg/ha entre 1970 e 1980), não havendo satisfatória tecnologia de produção (REGO NETO et alii, 1982). A fim de mudar este quadro, incrementando a produção através da sistematização do conhecimento e tecnologia disponíveis, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) promove, desde 1982, encontros nacionais para discussão e delineamento de diretrizes, já que o feijão-de-corda pode contribuir com parcela significativa do aporte protéico diário de uma população carente e que tem neste grão um de seus alimentos mais populares.

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. compreende três subespécies de importância agrônômica: subsp. *unguiculata*, subsp. *sesquipedalis* e subsp. *cylindrica*. Esta classificação foi reconhecida em 1973 pelo Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, e veio substituir a nomenclatura até então utilizada para estes grupos: *Vigna sinsensis* (L.) Savi, *Vigna sesquipedalis* (L.) Fruhw e *Vigna cylindrica* (L.) Skeels, respectivamente (FREIRE FILHO, et alii, 1982).

No meio rural e entre a população consumidora do Nordeste brasileiro, o feijão-de-corda é também conhecido por vários outros nomes, sendo os mais populares feijão-caupi (derivação do nome "cow pea", em língua inglesa), feijão-macassar ou feijão-de-rama (LE MOS & ALMEIDA, 1982).

Em outras regiões do globo, o feijão-de-corda é também

importante fonte protéica da dieta de populações rurais e urbanas, como nos países da África (especialmente na região oeste), da Ásia e América Central (OMUETI & SINGH, 1987; OGUN et alii, 1989). A Nigéria, os Estados Unidos, o Alto Volta e Uganda produzem juntos 90 % do total mundial (KOCHAR et alii, 1988).

A literatura refere teores protéicos de 24,9 à 29,2% (b.s.) (SGARBIERI, 1980). Existem trabalhos onde o fator de conversão utilizado para estimar o teor de proteína bruta é de 5,7; desta forma, Khan e colaboradores (1979) encontrou valores de 25,7 a 26,4% de proteína, (b.s.). É possível encontrar referências a valores tão altos quanto 36,04% (ESH et alii, 1959). Dois trabalhos distintos estudando cultivares puros catalogados junto ao "International Institute of Tropical Agriculture" (IITA) em Ibadan, Nigéria, encontraram teores protéicos de 23,0 a 31,3% (N x 6,25; 9,6 a 13,2% de umidade) em 24 cultivares (OMUETI & SINGH, 1987; KOCHHAR et alii, 1988).

Em relação à composição em aminoácidos, os teores de sulfurados encontrados no feijão-de-corda variam de 1,4 a 2,4 g/16 g N (SGARBIERI, 1980; KHAN et alii, 1979; KOCHHAR et alii, 1988). Existem referências à limitação também de isoleucina e triptofano em alguns cultivares (BLISS, 1972).

Os valores de digestibilidade *in vitro* do feijão-de-corda estão entre 77,8 e 91,0 %, enquanto os de digestibilidade *in vivo* (verdadeira, com correção a partir de dieta aprotéica) estão entre 87,0 e 92,0 % (SGARBIERI, 1980; KHAN et alii, 1979; BOULTER et alii, 1972).

O cultivar Pitiúba passou a integrar a relação dos cultivares melhorados de caupi do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, com o início do Programa Cooperativo de Pesquisas (PCP) em 1977, que contou com a participação do IITA (DE ARAÚJO et alii, 1987).

#### 2.1.4. A ervilha.

A ervilha é uma leguminosa cujo consumo destaca-se em países europeus (GUEGUEN & BARBOT, 1988), e no Oriente Médio (SGARBIERI & WHITAKER, 1982), e tem sido vista como uma opção de alimento integral para composição de refeições processadas (GUEGUEN & BARBOT, 1988). Na América Latina, é a terceira leguminosa mais consumida (JAFFÉ, 1986) e no Brasil, é apenas precedida pelos feijões (SGARBIERI, 1980). Em países africanos, como a Tanzânia, foi a segunda leguminosa mais produzida entre 1969 e 1971 (MOSHA, 1973).

Ao contrário dos feijões, a ervilha não necessita de cocção prolongada ou severa (como sob pressão) para se tornar apta ao consumo humano. Um cozimento brando, à pressão atmosférica, de cerca de 20 minutos é suficiente para ervilhas secas; quando frescas, o tempo de cozimento pode ser ainda menor (MEINERS et alii, 1976).

Em extenso trabalho de análise do teor protéico de ervilha (SLINKARD, 1972, apud REICHERT & MACKENZIE, 1982) foram encontrados valores de 15,5 a 39,7% em 1452 variedades. Alguns trabalhos trazem o teor protéico determinado em grãos decorticados, e os valores encontrados situam-se entre 14,5 e

34,1 % (b.s.) (EVANS & BOULTER, 1979; REICHERT & MACKENZIE, 1982). O trabalho de Romeo et alii (1983) traz o teor de 22,8 a 24,6 % de proteína bruta, para amostras com 9% de umidade. A exemplo das demais leguminosas, a ervilha possui importante teor de nitrogênio não protéico, o que faz com que a conversão do nitrogênio total por 6,25 em geral superestime a concentração deste nutriente. Em 1988, Gueguen e Barbot propuseram-se a estudar as frações protéicas de ervilhas e, trabalhando com 22 cultivares encontraram de 16,6 a 32,1 % de nitrogênio não protéico (em relação à percentagem total de nitrogênio). Desta forma, os teores de proteína bruta ( $N \times 6,25$ ) encontrados (entre 18,1 e 27,6 %) podem levar a expectativas menos otimistas de concentração protéica real.

A composição em aminoácidos da ervilha responde ao padrão geral das leguminosas no que diz respeito ao teor de sulfurados: de 0,66 a 0,78 g/16 g N de metionina e de 0,94 a 1,21 g/16 g N de cistina (EVANS & BOULTER, 1980).

Considerando-se o valor nutricional da ervilha, ela parece oferecer algumas vantagens em relação aos feijões, com uma digestibilidade aparente de 78 %, conforme determinado por Sarwar e Peace (1986) em experimento com dietas contendo 12 % de proteína.

O cultivar Torta-de-flor-roxa foi estudado no Instituto Agrônomo de Campinas onde os primeiros registros estão nos arquivos da Seção de Olericultura e Floricultura e datam de 1945, quando a instituição chamava-se Instituto Agrônomo do Estado. Até 1960, o cultivar foi avaliado quanto às

características de produção. A partir daí, foi utilizada em experimentos de melhoramento (INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO, 1945; CAMPOS, 1960). Trata-se de uma leguminosa cujo consumo no Brasil restringia-se ao produto importado, devido às características climáticas necessárias à produção. Com os estudos desenvolvidos para aclimação da cultura, em 1986 iniciou-se a tentativa de produção nacional (NAGAI, 1986).

#### 2.1.5. Grão-de-bico.

O grão-de-bico é uma leguminosa cuja origem não é precisa, mas há indicações de que a Índia, a Ásia Central e a região do Mediterrâneo foram os primeiros locais onde houve notícia de seu consumo (CHAVAN et alii, 1986). Entre as leguminosas, é a segunda em área cultivada e a terceira em produção, apenas precedida pelos feijões e pela ervilha (SINGH, 1985). Seu consumo destaca-se em alguns países africanos (Etiópia e Tanzânia), no Irã, México, Espanha e Índia. Este país produz 75 % do total mundial (SINGH, 1985; CHAVAN et alii, 1986).

As formas mais difundidas de preparo desta leguminosa envolvem maceração, fermentação, fervura, tostadura, fritura e cocção à vapor, das quais a maceração seguida de cocção é a mais comum (SINGH, 1985).

Também para este grão, os fatores ambientais e condições agriculturáveis determinam variação da concentração de nutrientes. Os teores de proteína referidos pela literatura variam de 16,1 % (SINGH et alii, 1983) à 30,5 % (CHAVAN et alii,

1986), com um teor de nitrogênio não protéico de 11,2 %, o qual é significativo e positivamente relacionado com o teor total de nitrogênio (SINGH, 1985).

Com base na determinação do escore químico, o grão-de-bico tem nos aminoácidos sulfurados os valores mais baixos, seguidos da valina, treonina e triptofano (SOTELO et alii, 1987; SINGH, D. et alii, 1988) sendo que os teores deste último podem diminuir com o processo de cocção (ABDEL-RAHMAN, 1983).

Quando comparado a outras leguminosas, o grão-de-bico apresenta grande diversidade quanto às informações disponíveis sobre fatores antinutricionais. Gallardo e colaboradores em 1974, (apud CHAVAN et alii, 1986) determinando a atividade do inibidor de tripsina nestes vegetais pôde ordená-los na seguinte ordem decrescente: soja, feijão-comum, fava, ervilha, lentilha e, por último, grão-de-bico. Conflitantemente, os dados de Chavan e Hejgaard de 1981, (apud CHAVAN et alii, 1986), colocam o grão-de-bico com maior teor do mesmo inibidor quando comparado a feijão-de-corda, fava e lentilha. Em relação às mesmas leguminosas, apresenta também maior atividade de inibidor de quimotripsina. Contudo, devido ao severo tratamento térmico necessário para sua cocção, estes inibidores não são os principais responsáveis pelo ainda limitado consumo desta leguminosa e sim a presença de elevadas quantidades de carboidratos não digeríveis (estaquiose, rafinose e verbascose), o que leva à formação de flatos (CHAVAN et alii, 1986). A fermentação, proporciona redução significativa do teor destes carboidratos (SINGH, 1985). Uma observação interessante referida

por Honavar e colaboradores (1962), diz respeito a redução do Quociente de Eficiência Protéica (ou P.E.R) nesta leguminosa em decorrência de cocção.

Alguns autores têm referido a aplicabilidade do grão-de-bico como base para a confecção de formulados infantis nos casos de intolerância à lactose e desnutrição (SOTELO et alii, 1987a; SOTELO et alii, 1987b; VALENCIA et alii, 1988) e para concentrados protéicos (ULLOA et alii, 1988).

Em relação ao seu valor nutricional in vivo, o grão-de-bico apresenta digestibilidade aparente de 75,31 à 84,10 % (BIRENDER et alii, 1987).

O cultivar IAC-Marrocos é originário do "Service de la Recherche Agronomique et de L'Expérimentation Agricole" de Rabat, Marrocos, e incorporado ao banco de germoplasma da Seção de Leguminosas do I.A.C. em 1964 e apresenta sementes menores em relação a outras importadas, com peso médio de 26 g/100 sementes (BRAGA et alii, 1989).

## 2.2. Avaliação da qualidade protéica

Datam do início do século XIX os primeiros estudos de valor nutritivo e digestibilidade de alimentos, quando então foram conduzidos experimentos com animais ou homens alimentados com os mais diversos tipos de dietas, inclusive com feijões (YOUNG, 1803, PRAUSNITZ, 1806 e MAGENDIE, 1816, apud OLIVEIRA, 1986). Neste período, os trabalhos avaliavam dietas cuja fonte

protéica derivava de mais de um alimento e eram conduzidos de maneira desuniforme e não precisa. Aspectos importantes como a densidade calórica eram também variáveis (MARTIN & ROBINSON, 1922). Após um século de importantes avanços, mas ainda resultado de observações assistemáticas, são conhecidos os trabalhos de Mitchell e Osborne, que desempenharam um papel de grande relevância para a nutrição experimental. Em artigo publicado no ano de 1923, Mitchell define algumas condições básicas para a avaliação biológica (termo definido por Thomas, citado pelo autor) de uma proteína e que são, ainda hoje, verdadeiros pré-requisitos para este tipo de investigação. Tais condições estabeleciam o que se segue:

- a) que a dieta em estudo contenha apenas a proteína ou a mistura protéica a ser investigada;
- b) que a dieta em estudo contenha o menor teor possível de substâncias nitrogenadas de natureza não protéica, exceto aquelas constituintes do alimento em estudo, e
- c) que a composição e a quantidade do alimento a ser consumido sejam tais que favoreçam a utilização da proteína exclusivamente para fins não energéticos.

Já nesta oportunidade o autor define metodologia para determinação do nitrogênio metabólico, através de dieta aprotéica e indica o produto da digestibilidade pelo valor biológico como mais um indicador de qualidade: a utilização líquida da proteína (NPU ou "net protein utilization"), denominada naquela oportunidade como valor líquido da proteína (MITCHELL, 1922, apud MITCHELL, 1923/24).

A partir da sistematização experimental seguiram-se estudos que objetivaram avaliar a influência dos níveis de ingestão de proteína em seu aproveitamento (MITCHELL, 1924) e estabelecer o requerimento de nitrogênio para seres humanos (MARTIN & ROBINSON, 1922).

Ainda no início do século surgiram estudos relacionando o incipiente conhecimento sobre a composição em aminoácidos das proteínas e seu valor nutricional. Assim, foram conhecidos os resultados das investigações de Kossel e Kutscher (1900), que trabalhavam com hidrólise de várias fontes protéicas, de Hopkins e Cole (1901), que identificaram o triptofano (apud MARTIN & ROBINSON, 1922) e de Sherman e Woods (1923), cujo objeto de estudo baseava-se na avaliação in vivo de proteínas com diferentes teores de cistina (apud MITCHELL & BLOCK, 1946).

Nas primeiras décadas do século, houve pouco estímulo às investigações sobre proteínas pois nesta época havia grande interesse em acompanhar o avanço do conhecimento sobre as recém-descobertas vitaminas. Em 1946, Mitchell e Block fazem uma revisão dos trabalhos conduzidos até aquele ano e que continham informações sobre composição de diferentes proteínas e seu valor biológico. Este levantamento permitiu aos autores o estabelecimento de correlação negativa entre a percentagem de deficiência do aminoácido limitante e o valor biológico da proteína, usando como referência a proteína de ovo integral. Neste mesmo ano, os autores publicam artigo no qual fazem discussão sobre a expressão "aminoácido limitante" e a real significação do escore químico como atributo nutricional de uma

proteína (BLOCK & MITCHELL, 1946). De fato, o conhecimento do aminoácido essencial em menor concentração na proteína não é conclusivo para caracterizar seu perfil; a concentração dos demais aminoácidos essenciais é também importante para avaliação de sua qualidade. Com esta perspectiva, Oser (1951) sugere a aplicação do "Índice de Aminoácidos Essenciais" ("EAA Index" ou "Essential Amino Acid Index"), o qual é obtido pela média geométrica das razões entre a concentração de 10 aminoácidos essenciais (arginina está incluída) na proteína em estudo e os valores de cada um na proteína do ovo. A avaliação pelo escore químico tem outras críticas: pode variar segundo o padrão de referência e segundo o método de determinação dos aminoácidos (SELIGSON & MACKEY, 1984).

Contudo, vários autores têm estabelecido a relação entre a composição das proteínas que estudam e seu desempenho in vivo, comparando não só o escore químico mas também a biodisponibilidade do aminoácido limitante com resultados de ensaios biológicos (KELLY & BLISS, 1975; SGARBIERI et alii, 1979), o que contribui para uma avaliação mais fiel da qualidade protéica.

Ainda a partir de artigos pioneiros, como os de Mitchell, Osborne e Mendel, seguem-se trabalhos que aplicam os métodos então já estabelecidos para a avaliação de diferentes proteínas e outros que visam medir sua eficácia e propõem alterações com vistas a diminuir as limitações originais (CHICK et alii, 1935).

Como exemplo pode-se citar o artigo de Bender e Doell

(1957) onde os autores propõem uma modificação à estimativa do quociente de eficiência protéica (PER, ou "protein efficiency ratio", estabelecido por Osborne e Mendel, apud OLIVEIRA, 1986) a fim de eliminar a interferência da quantidade de dieta ingerida. Este novo método foi chamado de quociente da proteína líquida (NPR, ou "net protein ratio") e introduziu a utilização de um grupo de animais em dieta aprotéica para determinar a perda de peso que deveria ser somada ao ganho de peso do grupo alimentado com a dieta teste. É contemporâneo a este outro método de avaliação que estabelece a utilização líquida da proteína (NPU, ou "net protein utilization") a partir da análise da carcaça de ratos (BENDER & MILLER, 1953 e MILLER & BENDER, 1955, apud BENDER & DOELL, 1956 e PELLET, 1978) como uma simplificação da proposta original (sic).

A identificação dos inibidores de proteases em leguminosas ocorreu em 1946 (BOWMAN, 1946, apud SGARBIERI & WHITAKER, 1982; KUNITZ, 1946), embora outro fator antinutricional de importância nesses vegetais dado o seu poder hemaglutinante, as lectinas, já houvesse tido sua ação referida em 1888 por Stilmark (apud SGARBIERI & WHITAKER, 1982).

Como resultado de muitas observações, pôde-se concluir que o valor nutritivo de uma proteína é o resultado da integração de vários fatores. Destaca-se sua composição, sua configuração espacial e susceptibilidade à digestão (que contribui para a biodisponibilidade dos aminoácidos) e a presença de outros componentes do alimento bem como as condições de processamento como determinantes de seu aproveitamento

biológico (OSER, 1951).

Na década de sessenta, como resultado do impulso pós segunda guerra mundial, os estudos relativos a proteínas baseavam-se na pré concepção de uma grande necessidade em propor fontes protéicas alternativas para suprir um colapso mundial de aporte dietético deste nutriente e conter a desnutrição. Houve então uma sucessão de propostas através do desenvolvimento de variedades genéticas de vegetais hiperprotéicas, fortificação com aminoácidos, proteínas monocelulares e misturas vegetais. Concomitantemente, ainda conduziam-se pesquisas no sentido de estabelecer requerimentos de proteína e as relações entre estes e os requerimentos energéticos (PELLET, 1978). Estes fatos históricos determinaram o direcionamento das pesquisas para a avaliação nutricional de fontes protéicas regionais disponíveis e que integrassem o hábito alimentar de povos com maiores índices de desnutrição energético protéica. A ênfase dada à importância das proteínas seria posteriormente criticada em função da constatação, pela comunidade científica internacional, de que a desnutrição é resultado de um estado carencial múltiplo e que o volume de investimentos destinado ao estudo de proteínas poderia ter sido melhor aplicado (MCLAREN, 1974). Neste contexto avançam os estudos sobre o valor protéico das leguminosas, com maior ênfase a partir da década de setenta (JAFFÉ, 1973; DUTRA DE OLIVEIRA, 1973; MOSHA, 1973; KELLY, 1975; BRESSANI et alii", 1976; MEINERS et alii, 1976; BRESSANI & ELIAS, 1977; TOBIN & CARPENTER, 1978; KHAN, 1979; SGARBIERI, 1980; SGARBIERI & WHITAKER, 1982; BRESSANI & ELIAS, 1984).

### 2.2.1. O nitrogênio endógeno

A inquietude gerada pela interferência do nitrogênio de origem endógena nas fezes (NEF, ou nitrogênio endógeno fecal) sobre os indicadores de avaliação protéica já acontecia à época dos primeiros estudos que estabeleciam estes indicadores. Como referido anteriormente, o trabalho de Mitchell de 1923 que propunha o estabelecimento do valor biológico como atributo nutricional de uma proteína sugere o uso de um grupo de animais em dieta aprotéica para a determinação da excreção de nitrogênio endógeno. Esta fração nitrogenada seria composta por material não reabsorvido originado de resíduos biliares, de sucos pancreático, gástrico e intestinal, bem como de descamação da mucosa intestinal (MITCHELL & BERT, 1954). Desde aquela época, buscava-se pela técnica mais adequada para maior precisão dos resultados.

Alguns pesquisadores indicavam que a excreção de NEF era constante e não relacionada à quantidade de alimento ingerido (THOMAS, 1909 e MARTIN & ROBINSON, 1922, apud SCHNEIDER, 1934), o que era contestado por outros resultados, segundo os quais não só a quantidade de alimento ingerido determinava a excreção de NEF bem como esta ação era variável para diferentes animais (MITCHELL, 1923/24). Em uma posição de certa forma conciliatória, Schneider (1934) refere que segundo suas observações e considerando que os autores precedentes trabalhavam com animais de diferentes idades existiriam dois determinantes para o NEF, de forma que não só a ingestão de alimento mas também o peso do animal determinaria maior ou menor

volume de secreções intestinais interferindo diretamente na quantidade de NEF. A relação direta entre peso corporal e excreção de nitrogênio urinário também foi estabelecida (CAUSERET et alii, 1965).

Smuts (1935) desenvolveu metodologia que, através da diminuição gradual da ingestão de nitrogênio até o fornecimento de uma dieta aprotéica, procurou conseguir determinar o NE fecal e urinário e pôde relacionar mais positivamente a excreção total com a superfície corporal do que com o peso do animal.

Dois problemas da dieta aprotéica passaram a determinar novas investigações: o fato de que os animais não cresciam e a dificuldade em garantir estável o volume de ingestão. Assim, passou-se a acrescentar às dietas uma pequena percentagem de proteína de ovo, entre 4 e 5% (MITCHELL & CARMAN, 1926). Assumindo que haveria total digestão, o nitrogênio fecal determinado seria exclusivamente de origem endógena. Essa pré concepção foi prontamente derrubada e outros métodos foram propostos. Estabelecendo a relação entre o nitrogênio fecal total e diferentes concentrações de nitrogênio dietético, seria possível através da projeção da regressão linear obtida, determinar a quantidade de nitrogênio endógeno, indicada pela intersecção da reta com o eixo y, correspondendo ao ponto zero de ingestão de nitrogênio (TITUS, 1927, apud BOSSHARDT & BARNES, 1946). Blaxter e Wood (1951), trabalhando com cães determinaram que a excreção de NEF estaria relacionada com a quantidade de fezes excretada, a qual seria diretamente dependente da digestibilidade da dieta, e não com a quantidade de dieta

consumida. Em uma tentativa de sugerir uma alternativa ao uso de animais em dieta aprotéica, Mitchell e Bert (1954) estabelecem regressão linear entre a razão obtida pelo nitrogênio fecal por matéria seca consumida e diferentes níveis de proteína (de 0,26 a 20,0%). Através dela, seria possível determinar o nitrogênio metabólico excretado por unidade de alimento seco consumido para ratos em crescimento, mas ainda de uma forma mais dispendiosa que o uso do método da dieta aprotéica. Essa metodologia ainda vem sendo utilizada por alguns autores (SARWAR & PEACE, 1986; KEITH & BELL, 1988).

Já nesta época estavam publicados os trabalhos de Schoenheimer empregando o uso de isótopos para estudos de metabolismo protéico e que serão abordados posteriormente. Seu pioneirismo deu origem a uma nova fronteira no conhecimento do valor nutricional das proteínas. Seguiram-se trabalhos empregando isótopos estáveis e radioativos em proteínas de diversas origens, como caseína e proteínas microbianas (LOFGREEN & KLEIBER, 1953; YAMAGUCHI et alii, 1973; WUTZKE, et alii, 1983; WUTZKE et alii, 1987), e especificamente o  $^{15}\text{N}$  para estudos de retenção e "turnover" de proteínas (SHARP et alii, 1957).

Com a evolução do conhecimento, o conceito de "pool" nitrogenado e de aminoácidos passou a ser analisado como agente determinante do metabolismo protéico, não só em relação à mucosa intestinal mas também ao nível hepático, sendo a excreção endógena de aminoácidos usada para estabilizar ou adequar as razões molares dos mesmos no lúmen intestinal (NASSET & JU, 1961). A idéia de que este "pool" pudesse contribuir para

mascarar a possível deficiência de aminoácidos em animais sob dieta aprotéica foi profundamente combatida. O conceito evoluiu com o progresso dos métodos analíticos e atualmente, o "pool" de aminoácidos é tido como o elo conector entre dois ciclos autônomos de nitrogênio. O primeiro, é definido pela troca entre o organismo e o meio ambiente, ou seja, pela ingestão e excreção; o segundo refere-se à síntese e degradação protéica, ao que convencionou-se denominar de "turnover". O fato de que o padrão de aminoácidos do "pool" é independente do padrão tissular, e que o mesmo é constante sob condições diferentes para uma mesma espécie, sugere que a concentração de cada aminoácido seja controlada independentemente (WATERLOW, 1984).

Experimentalmente as informações quanto à excreção obrigatória de material nitrogenado, obtidas a partir de animais submetidos à dieta aprotéica, traziam informações conflitantes. Os trabalhos referiam valores de 5 mg de nitrogênio no intestino 3 horas post cibum ao mesmo tempo em que outros encontravam 45 mg. Esta grande variação de resultados pode ser justificada, contudo, pelas diferenças metodológicas e experimentais entre os trabalhos (GEIGER et alii 1958; NASSET & JU, 1961). Portanto, o estabelecimento de indicadores precisos de qualidade protéica, obtidos por ensaios in vivo e considerando o material de excreção estaria na dependência da validação da origem do nitrogênio determinado (CAUSERET et alii, 1965).

De fato, o epitélio intestinal é o mais ativo do organismo. Por causa disto, a medida de ácidos nucléicos nas

fezes também pode ser usada para estimar a contribuição endógena de material nitrogenado nas fezes. Com esta técnica Da Costa e colaboradores (1971) pôde estabelecer que, de 84 g de proteína endógena intersticial eliminada em um dia, apenas 10 g eram de origem intracelular, resultado de esfoliamento do epitélio (8 a 15% do total). Em humanos, estima-se que há uma perda intestinal diária de 45 a 140 g de proteína (SPENCER, 1960; WILSON, 1962, apud DA COSTA et alii, 1971).

Em se tratando de dietas com leguminosas sabe-se que há incremento da excreção de material endógeno mesmo para grãos cozidos (BENDER & MOHAMMADIHA, 1981; BERGNER et alii, 1984; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a). Apesar do conhecimento da interferência do material endógeno desde o início do século, ainda não se sabe qual a contribuição das secreções digestivas e da descamação epitelial para a mistura nitrogenada intestinal (CHACKO & CUMMINGS, 1988). Contudo é possível, através da técnica da marcação isotópica da proteína de leguminosas, identificar a contribuição do nitrogênio endógeno no nitrogênio fecal e urinário e, assim, determinar com maior precisão os indicadores obtidos com dados de ingestão e excreção de nitrogênio (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986b).

#### 2.2.2. O uso de isótopos

O já citado pioneirismo de Schoenheimer no emprego de isótopos para o estudo do metabolismo protéico, trouxe contribuições importantes para a disseminação do uso destes

elementos. Em artigo de 1938, em co-autoria com Rittenberg, são apontadas as indicações dos diferentes isótopos usados até então: o deutério (hidrogênio 2) e o nitrogênio 15 ( $^{15}\text{N}$ ). Foi através da constatação de que a concentração do deutério é a mesma quer seja na água ou nos compostos orgânicos que a usam em seu metabolismo, que surgiu a indicação de que o metabolismo celular não é seletivo entre isótopos; ou seja, apesar da diferença física entre os mesmos (diferente número de nêutrons e, portanto, diferente número de massa), bioquimicamente são usados sem distinção.

Através da detecção destes elementos é possível aprofundar o conhecimento sobre proteínas e aminoácidos com grande refinamento e precisão, o que contribui para o esclarecimento dos mecanismos através dos quais estes compostos interagem com o organismo vivo. O uso de aminoácidos marcados proporcionou o conhecimento da dinâmica de degradação e síntese protéica, o que permitiu o estabelecimento do conceito de "pool" metabólico, definido como "mistura de compostos, derivados da dieta ou da degradação tissular, a qual o animal (...) emprega para síntese dos constituintes celulares" (SPRINSON & RITTENBERG, 1949). O uso de isótopos como traçadores têm sido empregado para decifrar as vias metabólicas de aminoácidos e nitrogênio em indivíduos sadios e enfermos, a fim de subsidiar o estabelecimento dos requerimentos de proteína e aminoácidos em ambas as situações (YOUNG, 1981; YOUNG, 1987).

Algumas condições para o emprego de isótopos em estudos de metabolismo são vida útil duradoura e inocuidade. Para

estudos in vivo e, principalmente com humanos, o uso de isótopos estáveis (como o hidrogênio 2, o carbono 13, o nitrogênio 15 e o oxigênio 18) apresenta-se como opção segura do ponto de vista ético e adequada devido à meia vida longa o bastante para permitir a condução de experimentos de metabolismo (SCHOENHEIMER & RITTEMBERG, 1938; WATERLOW et alii, 1978; YOUNG, 1981), com a qualidade de não alterá-lo (WUTZKE et alii, 1987).

Outra característica de interesse refere-se à estabilidade do isótopo durante os processos biológicos. Assim, o fato do oxigênio 18 apresentar-se em geral em grupos altamente reativos ( $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-C=O$  entre outros) favorece a perda do isótopo. Quanto a isso, o  $^{15}N$  apresenta melhores indicações para o estudo de qualidade protéica: além de distribuir-se na molécula ampla e difusamente, sua ligação é bastante estável (SCHOENHEIMER & RITTEMBERG, 1938).

O estudo do metabolismo protéico através do uso do  $^{15}N$  baseia-se na quantificação do isótopo como produto final no material de excreção do organismo (fezes e urina), o que pode ser feito de duas formas. Na primeira, o cálculo baseia-se na quantificação do traçador no produto final em diferentes tempos e após uma única dose, o que é definido como método compartimental; no segundo, conhecido como método estocástico, a quantificação considera a excreção cumulativa do isótopo, a partir de uma dose simples ou a partir da estabilização decorrente de uma administração contínua (WATERLOW et alii, 1978). Contudo, estas duas propostas consideram como produto final o  $^{15}N$  presente sob a forma de amônia ou uréia, que medem

fluxos originários de "pools" de aminoácidos livres diferentes (WATERLOW, 1984). Estes problemas podem ser significativamente diminuídos se, em lugar de administrar o  $^{15}\text{N}$  através de aminoácidos específicos, todos os aminoácidos estiverem igualmente marcados com o isótopo (WATERLOW, 1981) e ainda, que se quantifique todo o nitrogênio excretado. Durante muito tempo, não foi isto o que ocorreu, e, ainda hoje, os aminoácidos marcados representam um bom instrumento para a investigação do metabolismo protéico em humanos ou através de modelos biológicos (OLESEN et alii, 1954; WU et alii, 1959; WU & SENDROY, 1959; STEIN et alii, 1976; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a). Dentre os aminoácidos, a  $^{15}\text{N}$ -glicina parece ser o mais amplamente empregado, o que pode ser explicado pela sua maior disponibilidade e mais baixo custo (WATERLOW, 1981). Com este aminoácido marcado com  $^{15}\text{N}$ , Wu e Bishop (1959) demonstraram que sua aplicação e dosagem através de três produtos finais de eliminação (amônia, ácido hipúrico e uréia), dava origem a curvas de comportamentos bastante distintos. Os autores puderam concluir que a transferência do grupo  $-\text{NH}_2$  para os outros aminoácidos não é rápida a ponto de qualificar esta técnica como geradora de um "pool" de aminoácidos marcados logo após a administração do marcador. Desta forma, quando um aminoácido marcado, como a  $^{15}\text{N}$ -glicina, é empregado em ensaios biológicos, há que se considerar que, a rigor, os padrões de excreção do isótopo refletem aspectos particulares de seu metabolismo, pelo menos até que haja tempo para que as reações de transaminação possam disseminar o isótopo entre os demais

aminoácidos (WU et alii, 1959; WU & BISHOP, 1959; WU & SENDROY, 1959). Estima-se que o "pool" metabólico de nitrogênio hepático atinja o equilíbrio com o  $^{15}\text{N}$  entre 6 e 10 horas após a administração do isótopo, seja esta administração feita via oral ou intravenosa (STEIN et alii, 1976). Apesar destas considerações, Wutzke e colaboradores não encontrou diferenças significativas entre os resultados obtidos através da  $^{15}\text{N}$ -glicina em relação à proteína de levedura uniformemente marcada com  $^{15}\text{N}$  para o estudo da cinética de eliminação de nitrogênio em crianças (WUTZKE et alii, 1983).

Em relação ao uso de isótopos para estudo do valor nutritivo e da influência de leguminosas sobre a excreção de nitrogênio em modelos biológicos, existem poucos dados disponíveis. Em 1983, Fairweather-Tait e colaboradores publica os resultados de seus estudos com timidina marcada com trítio ( $^3\text{H}$ ). Os autores administraram este precursor do DNA por injeção intraperitoneal com o objetivo de observar a dinâmica de excreção fecal do isótopo em ratos alimentados com dietas contendo feijão cozido (*Phaseolus vulgaris*), estabelecendo comparação com um grupo controle, alimentado com dieta contendo caseína como fonte protéica. Seus resultados permitiram observar que, a eliminação de DNA da mucosa por ação da dieta com feijão foi 35% maior do que a referente ao grupo controle.

A técnica de marcação do animal foi também empregada para a avaliação da digestibilidade das proteínas do feijão-fava (*Vicia faba*) usando outro isótopo, o  $^{15}\text{N}$ . Neste caso, o animal incorporou o isótopo por ingestão de cloreto de amônio

enriquecido com 96 átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso misturado à sua dieta. A metodologia empregada para a determinação dos nitrogênios endógenos considerou que a abundância de  $^{15}\text{N}$  nas proteínas pancreáticas e nos demais órgãos do sistema digestivo é bastante semelhante àquela encontrada na urina destes animais, o que permite que a determinação da percentagem de  $^{15}\text{N}$  em excesso na urina seja uma boa indicação da eliminação do isótopo neste sistema. Os resultados demonstraram valores de digestibilidade superiores quando calculados pela técnica da marcação isotópica, em relação à técnica do balanço de nitrogênio total (BERGNER et alii, 1984).

A utilização do  $^{15}\text{N}$  como marcador de proteínas de leguminosas através da incorporação pelo vegetal durante seu desenvolvimento para estudo de seu valor nutricional foi proposta por Oliveira e Sgarbieri (1986b). Estes autores determinaram, através da marcação isotópica, a contribuição do nitrogênio de origem endógena para o nitrogênio total encontrado nas fezes e urinas de ratos. Desta forma, compararam indicadores de qualidade protéica (digestibilidade e valor biológico), obtidos através do balanço de nitrogênio total (aparentes) com os determinados pela correção com o nitrogênio excretado por grupo de animais em dieta aprotéica (verdadeiros) e ainda com aqueles obtidos através da correção com os nitrogênios endógenos determinados pela excreção do isótopo (aos quais propuseram a denominação de "reais"). Sem a interferência do material de origem endógena, os valores encontrados para digestibilidade e valor biológico reais de proteína de feijão-comum (*Phaseolus*

vulgaris) foram superiores aos aparentes e verdadeiros, indicando a impropriedade da utilização de dieta aprotéica para ensaios nutricionais de leguminosas. Isto se deve à já referida estimulação que estes vegetais exercem sobre a eliminação de nitrogênio endógeno (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986b; OLIVEIRA et alii, 1988). Posteriormente, Lanfer Marquez e Lajolo (1988) utilizando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como fontes dos isótopos  $^{15}\text{N}$  e  $^{35}\text{S}$  (este último radioativo) durante o cultivo, obtiveram grãos de feijão-comum marcados e procederam avaliação das excreções de nitrogênio total e marcado, em dietas contendo a farinha integral ou as frações globulina e albumina, após autoclavagem (121 graus Celsius por 30 minutos). Os resultados mostraram valores de digestibilidade reais superiores aos aparentes e indicam aumento da excreção de nitrogênio endógeno decorrente da influência do feijão.

O  $^{15}\text{N}$  é o isótopo estável mais difundido para estudos de metabolismo protéico (FERN et alii, 1981), para o que contribui sua inocuidade em estudos com humanos. Esta não era a realidade antes da transposição de duas limitações que justificavam a ampla divulgação de isótopos radioativos: a dificuldade de acesso a fontes enriquecidas para síntese química ou bioquímica, já citada neste trabalho, e de métodos analíticos disponíveis (BIER et alii, 1981). O advento da cromatografia gasosa por espectrometria de massa ("gas chromatography-mass spectrometry", ou GCMS), tornou a detecção de isótopos estáveis acessível com grande grau de precisão (BIER & MATHEWS, 1982; WATERLOW, 1984).

A abundância natural do  $^{15}\text{N}$  é de 0,375 átomos % e o

nível de sensibilidade da análise é de 0,025 átomos % em excesso, tornando viável a medida do isótopo após a diluição naturalmente recorrente da distribuição do traçador durante o metabolismo (HALLIDAY & READ, 1981; HALLIDAY, 1981; BIER & MATHEWS, 1981; BIER & MATHEWS, 1982).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material.

##### 3.1.1. Fontes protéicas.

Neste trabalho utilizou-se sementes de quatro gêneros da família "Leguminosae", a saber: feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar Aroana 80; ervilha (*Pisum sativum*, L.) cultivar Torta-de-flor-roxa; grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L.) cultivar IAC-Marrocos, procedentes do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*, L. Walp.) procedente do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPAP/EMBRAPA), em Goiânia, G.O..

Para obtenção dos grãos marcados com nitrogênio 15, estas sementes foram cultivadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), em Piracicaba, S.P., sob mesmas condições de solo, clima e tratamentos culturais.

Utilizou-se como fonte protéica controle, caseína comercial.

##### 3.1.2. Animais.

Utilizou-se 75 ratos albinos machos da linhagem Wistar, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas.

Ao serem recebidos, os ratos pesavam  $57,72 \pm 4,15$  g (primeiro ensaio) e  $51,09 \pm 5,14$  g (segundo ensaio) e tinham 23 e 21 dias, respectivamente. Os animais foram mantidos com água e ração comercial ("Lábina" da Purina) à vontade, em gaiolas de crescimento individuais por 8 (primeiro ensaio) e 10 dias (segundo ensaio), em ambiente com controle de temperatura (22 graus Celsius) e ciclos de luz e escuro alternados a cada 12 horas (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1977). Este período destinou-se à adaptação dos animais ao Laboratório de Ensaaios Biológicos e permitiu que ao início de ambos os ensaios, os animais estivessem com a mesma idade (31 dias) e pesos semelhantes, de  $97,07 \pm 7,28$  g no primeiro ensaio e de  $96,30 \pm 7,58$  g no segundo ensaio.

### 3.2. Métodos.

#### 3.2.1. Cultivo das sementes.

As sementes dos quatro gêneros de leguminosas foram plantadas em canteiro experimental do CENA que media 16 metros quadrados, sendo 4 metros quadrados para cada cultura. Nas bordas do canteiro foram plantadas duas fileiras adicionais da cultura marginal, para proteção de todo o canteiro.

A disposição das culturas está esquematizada na Figura 1, e pode ser vista nas Figuras 2 e 3.

O cultivo das sementes obedeceu às fases descritas abaixo:

- a) Desinfecção. Por aplicação do fungicida "Lesan" nas sementes, previamente à semeadura.
- b) Preparo do canteiro experimental. Com aplicação de pentóxido de fósforo (300 kg/ha), óxido de potássio (100 kg/ha) e micronutrientes (20 kg/ha, mistura comercial FTE-BR 12), em sulco profundo, abaixo do sulco de plantio.
- c) Plantio. As sementes foram colocadas nos sulcos, com espaçamento de 0,25 m entre fileiras e de 0,05 m em cada fileira. Data do plantio: 03 de agosto de 1988.
- d) Desbaste. três dias após a germinação foi retirada uma planta a cada 0,1 m.
- e) Adubação nitrogenada. Empregou-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, com cerca de 10 átomos por cento de nitrogênio 15. O  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi diluído em água destilada (62 g/L) e aplicado a cerca de 0,1 m da linha da planta. Cada linha recebeu 500 ml da solução, três dias após a germinação, o que corresponde a 66 kg de nitrogênio/ha.
- f) Aplicação de defensivos. A fim de prevenir a ação de insetos, aplicou-se inseticida via solo ("Jemik") e, para prevenir a ação de fungos, usou-se aplicação foliar de fungicida ("Cercobin").

## CANTEIRO EXPERIMENTAL

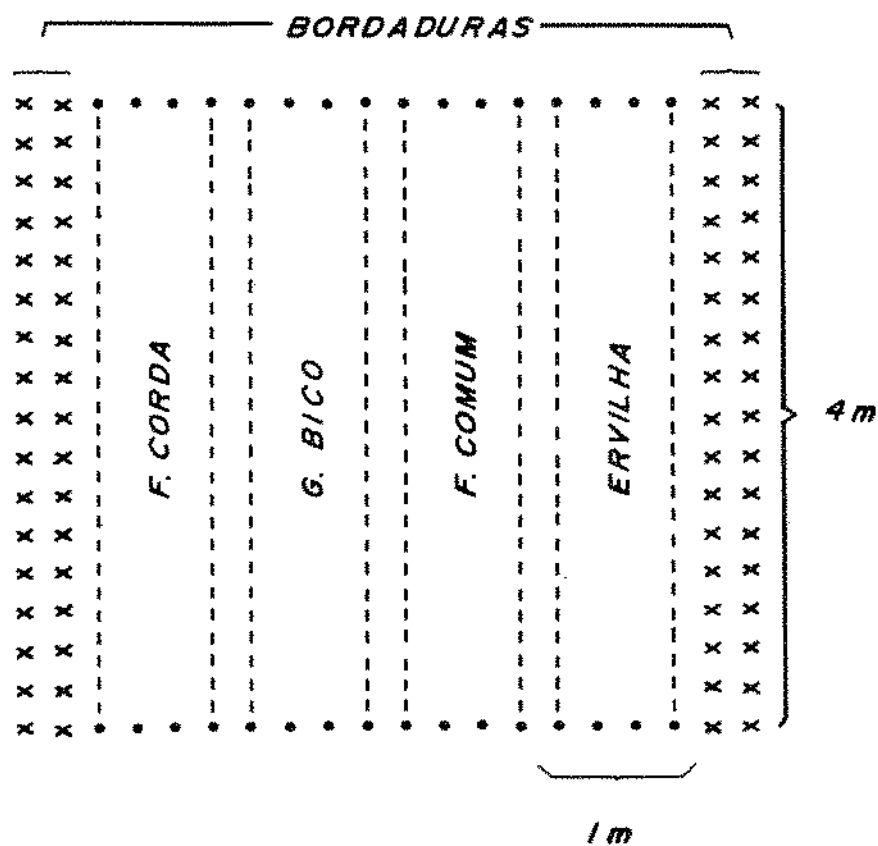


Figura 1. Esquema simplificado do canteiro experimental e disposição das culturas.



Figura 2. Vista do canteiro experimental, aos 26 dias do plantio, e disposição das culturas: 1. feijão-de-corda; 2. grão-de-bico; 3. feijão-comum; 4. ervilha.



Figura 3. Vista do canteiro experimental, aos 42 dias do plantio, e disposição das culturas: 1. feijão-de-corda; 2. grão-de-bico; 3. feijão-comum; 4. ervilha.

### 3.2.2 Determinações químicas.

3.2.2.1. Nitrogênio. Determinado pelo método de KJELDAHL (semi-micro), usando sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) (GUNNING, 1889; ARNOLD & WEDEMEYER, 1892, apud MONTES, 1966) e dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) (WILLIAMS, 1973), como catalisadores da digestão das amostras.

3.2.2.2. Nitrogênio 15 ( $^{15}N$ ). Determinado segundo Bremner (1965) e International Atomic Energy Agency (1972), com espectrômetro de massa Varian-Matt 230, a partir dos titulados concentrados obtidos nas determinações de nitrogênio.

3.2.2.3. Aminoácidos. Conforme Beckman Instruments (1977) em analisador automático Beckman 119CL, por cromatografia de troca iônica em resina de estireno polivinil-benzênica sulfonada.

O cálculo do escore químico foi feito conforme Food and Agriculture Organization (1973).

3.2.2.4. Composição centesimal. Foram feitas as seguintes determinações para o estudo da composição centesimal:

a) Proteína bruta. Por multiplicação dos teores de nitrogênio obtidos pelos fatores de conversão 6,25 para as leguminosas e 6,38 para a caseína (PAULL & SOUTHGATE, 1978).

b) Lípides totais: segundo Bligh e Dyer, (1959).

c) Fibra: como fibra bruta, pelo método "Weende", conforme Pearson (1976).

d) Umidade: por gravimetria, método 14.003 da A.O.A.C. (1980).

e) Cinzas: segundo Lees (1979).

f) Carboidratos: por diferença.

### 3.2.3. Ensaios biológicos.

3.2.3.1. Preparo das fontes protéicas. Os grãos marcados isotopicamente apresentavam diferentes percentagens de nitrogênio  $^{15}$ . Com o objetivo de que as diferentes dietas apresentassem marcação isotópica semelhante, usou-se a percentagem de  $^{15}\text{N}$  do feijão-comum como referência e procedeu-se a mistura dos grãos de ervilha produzidos na área útil com grãos produzidos na bordadura do canteiro, que também incorporaram  $^{15}\text{N}$ , mas em menores proporções. Os grãos de grão-de-bico foram misturados com as sementes-mãe, usadas para semear a cultura e que, portanto, não estavam marcadas com  $^{15}\text{N}$ . Os grãos de feijão-de-corda, pela pequena taxa de marcação, foram usados sem mistura. O cálculo das proporções dos grãos para as misturas foi feito com base na regra de mistura através do quadrado de Pearson (SNEDECOR, 1948). A Tabela 1 traz as percentagens de  $^{15}\text{N}$  em excesso (a distribuição do isótopo  $^{15}\text{N}$  é de  $0,375 \pm 0,008$  % do nitrogênio total na natureza, conforme determinado neste trabalho) dos grãos usados para a mistura e a proporção dos mesmos.

Para seu emprego nas dietas, os grãos marcados isotopicamente e já na mistura desejada foram selecionados, lavados em água corrente e macerados por 12 horas em água da rede de abastecimento (1:2 v/v) após o que foram cozidos com o acréscimo de mais um volume de água.

Os grãos de feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico foram cozidos sob pressão durante 20, 15 e 40 minutos (contados a partir do início da fervura) respectivamente.

TABELA 1. Percentagens de 15 N em excesso dos grãos de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico, proporção empregada para mistura \* e percentagem de 15 N em excesso obtido nas dietas.

| GRÃO     | ORIGEM DOS GRÃOS   | % 15 N EM<br>EXCESSO | PROPORÇÃO<br>MISTURA % | % 15 N EM<br>EXCESSO NA<br>DIETA |
|----------|--------------------|----------------------|------------------------|----------------------------------|
| ERVILHA  | área útil          | 1,100                | 71,43                  |                                  |
|          | 1ª linha bordadura | 0,500                | 22,86                  | 0,801                            |
|          | 2ª linha bordadura | 0,000                | 5,71                   |                                  |
| F. COMUM | área útil          | 0,899                | 100,00                 | 0,832                            |
| F. CORDA | área útil          | 0,144                | 100,00                 | 0,138                            |
| G. BICO  | área útil          | 1,045                | 83,85                  | 0,896                            |
|          | sementes-mãe       | 0,000                | 16,65                  |                                  |

\* Valores obtidos através do quadrado de Pearson (SNEDECOR, 1948).

Os grãos de ervilha foram cozidos por 20 minutos à pressão atmosférica. Para o estabelecimento do tempo de cocção, considerou-se aquele necessário para que os grãos adquirissem textura adequada ao consumo, conforme procedimento doméstico. O material cozido foi integralmente liofilizado em equipamento VIRTIS (modelo 10.146 MR-BA) e moído em moinho de facas Buchler LC 200.

3.2.3.2. Preparo das dietas. As dietas foram preparadas para conter 10 % de proteína bruta, 8 % de lipídes (A.O.A.C. 1975) e ainda 4 % de mistura mineral (HEGSTED et alii, 1941), 2 % de mistura vitamínica para fortificação de dieta (NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION, 1977/78) e 3 % de fibra. O teor de lipídes e de fibra das fontes protéicas foi considerado para a formulação das dietas. Desta forma, acrescentou-se óleo vegetal para completar 8 % (de soja "Lisa") e não acrescentou-se fibra. Nas dietas controle (com caseína como fonte protéica) e aprotéica, acrescentou-se celulose (microfina, grau farmacêutico, Microcel, de Blanver) para alcançar os níveis de fibra das dietas teste. A mistura salina e a mistura vitamínica estão dispostas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Às dietas foi acrescentada uma mistura de carboidratos, composta por amido de milho ("Maizena") e açúcar refinado ("União"), em uma proporção de 3:1 (p/p), de forma a apresentarem-se isocalóricas e isoprotéicas.

Preparou-se também uma dieta controle, cuja fonte protéica utilizada foi a caseína, e outra aprotéica, de forma a que sua composição centesimal não diferisse das dietas teste. Na dieta

TABELA 2. Formulação da mistura salina\* utilizada para o preparo das dietas.

| COMPONENTE           | FÓRMULA                                                                       | PERCENTAGEM |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Carbonato de cálcio  | $\text{CaCO}_3$                                                               | 29,974      |
| Fosfato di-potássico | $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                                      | 32,222      |
| Fosfato mono-cálcico | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                                    | 7,493       |
| Sulfato de magnésio  | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                                     | 10,191      |
| Cloreto de sódio     | $\text{NaCl}$                                                                 | 16,735      |
| Citrato férrico      | $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sic) | 2,747       |
| Iodeto de potássio   | $\text{KI}$                                                                   | 0,079       |
| Sulfato de manganês  | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$                                     | 0,499       |
| Cloreto de zinco     | $\text{ZnCl}_2$                                                               | 0,024       |
| Sulfato de cobre     | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$                                     | 0,029       |

\* Conforme Hegsted et alii (1941).

TABELA 3. Formulação da mistura vitamínica\* utilizada para o preparo das dietas.

| COMPONENTE                               | PERCENTAGEM |
|------------------------------------------|-------------|
| Concentrado de vitamina A (200.000 UI/g) | 2,948       |
| Concentrado de vitamina D (400.000 UI/g) | 0,163       |
| Alfa-tocoferol                           | 3,276       |
| Ácido ascórbico                          | 29,486      |
| Inositol                                 | 3,276       |
| Cloreto de colina                        | 49,144      |
| Menadiona                                | 1,474       |
| Ácido p-aminobenzóico                    | 3,276       |
| Niacina                                  | 2,948       |
| Riboflavina                              | 0,655       |
| Hidrocloreto de piridoxina               | 0,655       |
| Hidrocloreto de tiamina                  | 0,655       |
| Pantotenato de cálcio                    | 1,965       |
| Biotina                                  | 0,013       |
| Ácido fólico                             | 0,058       |
| Vitamina B <sub>12</sub>                 | 0,001       |

\* Conforme Nutritional Biochemicals Corporation (1977/78).

aprotéica, a fração proteína foi substituída por carboidrato.

A formulação das dietas pode ser vista na Tabela 4, descrita conforme American Institute of Nutrition, 1984.

3.2.3.3. Determinação dos indicadores de qualidade protéica. Após o período de adaptação ao Laboratório de Ensaio Biológicos, os animais foram mantidos por 24 horas em jejum (SGARBIERI et alii, 1982), recebendo apenas água. Este procedimento visou permitir o esvaziamento do sistema digestivo dos animais, para que não houvesse interferência de resíduos da dieta precedente sobre as determinações de nitrogênio e de  $^{15}\text{N}$  necessárias ao estabelecimento do valor protéico das leguminosas em estudo. Ao final deste período, os animais apresentavam peso médio de  $82,69 \pm 6,42$  g (primeiro ensaio) e  $88,41 \pm 13,11$  g (segundo ensaio).

Para que fossem distribuídos entre os tratamentos de forma a que as médias de peso não diferissem, foram eliminados os pesos extremos e empregou-se a distribuição dos pesos por ordem decrescente em lotes de seis animais (correspondente ao número de tratamentos, sendo quatro dietas teste, uma controle e uma aprotéica). Assim, para compor cada grupo (referente a um tratamento), procedeu-se o sorteio de um animal de cada lote, de forma a distribuí-los aleatoriamente entre os tratamentos (BENDER et alii, 1982). Para o segundo ensaio, só existiram cinco tratamentos, uma vez que não se repetiu a dieta de grão-de-bico, por falta de material decorrente do pequeno rendimento desta cultura na fase de campo. As Tabelas 5 e 6 trazem os pesos por animal de cada tratamento e as médias de

TABELA 4. Formulação das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.

| COMPONENTE  | DIETA   |         |         |         |         |           |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
|             | ERVILHA | F.COMUM | F.CORDA | G. BICO | CASEÍNA | APROTÉICA |
| Ervilha     | 376,5   | —       | —       | —       | —       | —         |
| F.comum     | —       | 399,5   | —       | —       | —       | —         |
| F.corda     | —       | —       | 385,1   | —       | —       | —         |
| G.bico      | —       | —       | —       | 608,4   | —       | —         |
| Caseína     | —       | —       | —       | —       | 114,9   | —         |
| Óleo veg.*  | 70,0    | 70,0    | 70,0    | 50,0    | 80,0    | 80,0      |
| Mist.sal.** | 40,0    | 40,0    | 40,0    | 40,0    | 40,0    | 40,0      |
| Mist.vit.#  | 20,0    | 20,0    | 20,0    | 20,0    | 20,0    | 20,0      |
| Celulose    | —       | —       | —       | —       | 30,0    | 30,0      |
| Carboid.¥   | 1000,0  | 1000,0  | 1000,0  | 1000,0  | 1000,0  | 1000,0    |
| (q.s.p.)    |         |         |         |         |         |           |

\* de soja "Lisa".

\*\* Hegsted et alii (1941).

# N.B.C. (1977/78).

¥ Amido de milho "Maizena" e açúcar refinado "União" 3:1 p/p

TABELA 5. Distribuição dos animais por tratamento, segundo os pesos individuais, e valores médios e desvios padrão obtidos para cada tratamento. (Primeiro ensaio).

| TRATAMENTO | PESOS DOS ANIMAIS (g) |      |      |      |      |      | MÉDIA<br>+- DP |
|------------|-----------------------|------|------|------|------|------|----------------|
|            | 1                     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |                |
| ERVILHA    | 79,0                  | 79,0 | 83,0 | 89,0 | 90,0 | 85,0 | 84,2+-4,8      |
| F.COMUM    | 76,0                  | 79,0 | 82,0 | 85,0 | 89,0 | 91,0 | 83,7+-5,3      |
| F.CORDA    | 79,0                  | 81,0 | 82,0 | 85,0 | 86,0 | 90,0 | 83,8+-5,8      |
| G.BICO     | 89,0                  | 80,0 | 79,0 | 85,0 | --   | --   | 83,5+-4,7      |
| APROTÉICA  | 76,0                  | 80,0 | 84,0 | 85,0 | 86,0 | 91,0 | 83,7+-5,2      |
| CASEÍNA    | 84,0                  | 82,0 | 89,0 | 85,0 | 88,0 | 86,0 | 85,7+-2,3      |

TABELA 6. Distribuição dos animais por tratamento segundo os pesos individuais, e valores médios e desvios padrão obtidos para cada tratamento. (Segundo ensaio).

| TRATAMENTO | PESOS DOS ANIMAIS (g) |      |      |      |      |       | MÉDIA<br>+- DP |
|------------|-----------------------|------|------|------|------|-------|----------------|
|            | 1                     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6     |                |
| ERVILHA    | 87,0                  | 91,0 | 92,0 | 95,0 | 96,0 | 97,0  | 93,0+-3,7      |
| F.COMUM    | 83,0                  | 91,0 | 92,0 | 94,0 | 97,0 | 98,0  | 92,5+-5,4      |
| F.CORDA    | 88,0                  | 89,0 | 91,0 | 95,0 | 95,0 | 100,0 | 93,0+-4,5      |
| APROTÉICA  | 83,0                  | 89,0 | 91,0 | 93,0 | 95,0 | 97,0  | 91,3+-5,0      |
| CASEÍNA    | 83,0                  | 89,0 | 92,0 | 92,0 | 96,0 | 101,0 | 92,2+-6,1      |

peso obtidas, em cada ensaio.

Os animais já distribuídos foram mantidos individualmente nas gaiolas de crescimento por 48 horas, recebendo as dietas teste e água. Este período destinou-se a permitir que a diluição isotópica do  $^{15}\text{N}$  nas fezes atingisse um equilíbrio, conforme determinado por Oliveira (1986), que observou elevação das percentagens de  $^{15}\text{N}$  fecal durante as primeiras 48 horas de administração das dietas marcadas para ratos. A constância das percentagens de  $^{15}\text{N}$  fecal após este período, indicou adaptação do animal à dieta.

Após as 48 horas de adaptação à dieta os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais, para a coleta de fezes a cada 24 horas, o que foi feito também durante a adaptação, e urina. Através do balanço de nitrogênio de quatro dias pôde-se estabelecer:

- a) Digestibilidade aparente e verdadeira (WOLZAK et alii, 1981; LIENER & THOMPSON, 1980);
- b) Valor Biológico aparente e verdadeiro (MITCHELL, 1923/24);
- c) Utilização Líquida da Proteína aparente e verdadeira (PIKE & BROWN, 1967);
- d) Digestibilidade, Valor Biológico e Utilização Líquida da Proteína reais (OLIVEIRA, 1986).

Foi feito controle de ganho de peso dos animais após a adaptação à dieta (48 horas iniciais) e após o período de balanço (96 horas).

Durante a realização dos ensaios, foram mantidas as condições ambientais do Laboratório de Ensaio Biológicos, bem

como a rotina de manipulação dos animais (coleta de fezes, troca de água e de dieta a intervalos regulares de 24 horas).

#### 3.2.4. Tratamento estatístico.

Empregou-se a distribuição completamente randomizada ("Completely Random Design" ou CRD) para o delineamento experimental (BENDER et alii, 1982).

Os valores obtidos dos ensaios foram submetidos à análise de variância e, quando diferentes ao teste F, analisados de acordo com Duncan (1955), ao nível de 95%, para verificar diferenças entre os mesmos.

Para a determinação de correlações, optou-se pela eleição do melhor coeficiente de correlação obtido entre as regressões linear, exponencial e potencial (SNEDECOR, 1948), classificado segundo Levin (1978).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Cultivo e caracterização dos grãos.

##### 4.1.1. Dados de produção.

A Tabela 7 traz as informações sobre o desempenho das culturas. Todas as culturas germinaram à mesma época, e a primeira a florescer foi a de ervilha, sendo a que mais se aproximou do período referido pela literatura, de 26 dias (CAMPOS, 1960). O grão-de-bico apresentou florescimento precoce, desde que estima-se para o cultivar o aparecimento de flores entre 60 e 70 dias após a emergência (BRAGA et alii, 1989). Para o feijão-comum e o feijão-de-corda, o florescimento foi tardio, havendo referências de 35 à 40 dias para o primeiro e 25 a 60 dias após a emergência para o segundo (POMPEU, 1982; FREIRE FILHO et alii, 1978).

Os ciclos da ervilha, feijão-comum e do grão-de-bico corresponderam aos ciclos médios destas culturas (55 a 110 dias para a ervilha, 90 a 100 dias para o feijão-comum e 120 a 140 dias para o grão-de-bico). Já o feijão-de-corda apresentou ciclo longo, uma vez que o estimado para este grão vai de 80 a 110 dias (FREIRE FILHO et alii, 1978; POMPEU, 1982; NAGAI, 1986; BRAGA et alii, 1989).

A produção resultou em um rendimento superior à média de produção destes grãos, que é de 1.500 kg/ha para ervilha, 2.200

TABELA 7. Períodos de germinação, floração e colheita dos grãos de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico, durante cultura para incorporação de nitrogênio 15. Registros em dias após plantio (D.A.P.) e dias após germinação (D.A.G.).

| CULTURA         | GERMINAÇÃO | FLORAÇÃO |     | COLHEITA |         | RENDIMENTO<br>(kg/ha) |
|-----------------|------------|----------|-----|----------|---------|-----------------------|
|                 | DAP        | DAP      | DAG | DAP      | DAG     |                       |
| ERVILHA         | 8 - 10     | 39       | 31  | 82       | 74      | 2.000                 |
| FEIJÃO-COMUM    | 8 - 10     | 64       | 56  | 92-106   | 84-98   | 5.000                 |
| FEIJÃO-DE-CORDA | 8 - 10     | 78       | 70  | 139-149  | 131-141 | >7.000                |
| GRÃO-DE-BICO    | 8 - 10     | 60       | 52  | 127      | 119     | 410                   |

kg/ha para o feijão-comum e 1.300 kg/ha para o feijão-de-corda. Sob condições experimentais, os tratamentos culturais são bastante diferenciados daqueles normalmente dispensados à cultura no campo, o que contribuiu para o rendimento encontrado. A necessidade de inibir a fixação simbiótica de nitrogênio para otimizar a incorporação do isótopo fornecido através da adubação justificou o emprego de cerca de 66 kg de nitrogênio por hectare, quando recomenda-se em geral cerca de 20 a 40 kg/ha para leguminosas, havendo pequena variação desta recomendação segundo a espécie e a época de adubação (NAGAI, 1986; BRAGA et alii, 1989; BRAGA & BULISANI, 1990). Acreditamos que também este fator foi determinante para o rendimento obtido. O grão-de-bico, ao contrário, não respondeu da mesma forma, rendendo cerca de 1/3 do esperado para esta leguminosa, que situa-se entre 1.200 e 2.400 kg/ha (BRAGA et alii, 1989; BRAGA & BULISANI, 1990), e correspondeu ao rendimento do que produzia-se em 1958 (MIYASAKA, 1961). De fato, a cultura apresentou problemas, como acometimento por doenças que não pudemos identificar e ataque de predadores; além disto, a proximidade com o canteiro onde estava plantado o feijão-de-corda, que apresentou plantas excessivamente grandes, pode ter causado prejuízo ao desenvolvimento do grão-de-bico por competição por nutrientes e limitação de exposição à luz.

#### 4.1.2. Composição centesimal.

A ervilha, o feijão-comum e o feijão-de-corda apresentaram teores de proteína bruta bastante semelhantes, ao

contrário do grão-de-bico, que apresentou o menor teor protéico. Embora a diferença seja notável, os valores encontrados tanto para os três primeiros quanto para o último, estão de acordo com o referido pela literatura para estes grãos: 21,0% para ervilha, 18,8 a 21,5% para o feijão-comum (MEINERS et alii, 1976), 20,0 a 24,6% para o feijão-de-corda (DEL ROSÁRIO et alii, 1981) e 12,4 a 30,6% para o grão-de-bico (CHAVAN et alii, 1986).

A determinação de lípidos foi feita pelo método de Bligh e Dyer (1959), que expressa lípidos totais considerando também o teor de lípidos polares. Um dos métodos mais aceitos e o oficial sugerido pela Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) para determinação de gordura é o que considera o extrato etéreo (Soxhlet) e que, portanto, só quantifica lípidos não polares, resultando assim em valores inferiores aos obtidos pelo método empregado neste trabalho. Os valores encontrados demonstram que o grão-de-bico destaca-se dos demais grãos pelo alto teor de matéria graxa, enquanto os demais apresentaram cerca de 1/3 do seu conteúdo em lípidos totais. Os valores referidos pela literatura, embora não obtidos pelo mesmo método, confirmam o fato de ser o grão-de-bico mais rico em gorduras do que os demais grãos estudados neste trabalho: Meiners e colaboradores (1976) encontrou 1,3% de lípidos para o feijão-de-corda, 1,0 à 1,5 % para o feijão-comum, 1,0 % para a ervilha e 5,0% para o grão-de-bico, empregando a determinação do extrato etéreo.

Em relação ao teor de fibra bruta, os resultados mostram que o grão-de-bico apresentou o menor teor de fibra

seguido pelo feijão-comum, pela ervilha e pelo feijão-de-corda. A determinação de fibra bruta é uma das quais traz maior diversidade de resultados entre os trabalhos referidos pela literatura, o que pode ser ilustrado pela revisão sobre grão-de-bico feita por Chavan e colaboradores (1986) que compilou valores de fibra bruta para esta leguminosa de 1,2 à 13,5%. Desta forma, os valores encontrados neste trabalho são referendados por várias informações (MEINERS et alii, 1976; DEL ROSÁRIO et alii, 1981; OMUETI & SINGH, 1987).

Os teores de cinzas esperados para leguminosas são da ordem de 2,0 à 4,5% (MEINERS et alii, 1976; GEERVANI & TEOPHILUS, 1980; DEL ROSÁRIO et alii, 1981; CHAVAN et alii, 1986; OMUETI & SINGH, 1987), e estão de acordo com os valores encontrados neste estudo: a ervilha apresentou o menor teor, seguida pelo feijão-comum, feijão-de-corda e pelo grão-de-bico, nesta ordem.

Os dados obtidos quanto à composição centesimal estão dispostos na Tabela 8.

#### 4.1.3. Composição em aminoácidos.

O resultado da determinação da composição em aminoácidos das quatro leguminosas pode ser visto na Tabela 9 que mostra também o escore químico obtido em relação ao padrão teórico de referência da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1980). O método utilizado não permite a determinação do triptofano, e, sendo que as leguminosas reconhecidamente apresentam limitação em aminoácidos

TABELA 8. Composição centesimal (g/100 g) das fontes protéicas  
ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão de bico.

| FONTE    | PROTEÍNA<br>BRUTA | LÍPIDES<br>TOTAIS | FIBRA<br>BRUTA | CINZAS | UMIDADE | CARBOI_<br>DRATOS* |
|----------|-------------------|-------------------|----------------|--------|---------|--------------------|
| ERVILHA  | 22,29             | 2,08              | 3,34           | 2,50   | 11,29   | 58,50              |
| F. COMUM | 20,15             | 1,92              | 2,45           | 3,00   | 10,26   | 62,22              |
| F. CORDA | 21,99             | 2,00              | 3,76           | 3,50   | 10,51   | 58,24              |
| G. BICO  | 15,77             | 6,32              | 1.83           | 3,60   | 8,52    | 63,96              |

\* Valores obtidos por diferença.

TABELA 9. Composição em aminoácidos das fontes protéicas, ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, em g/16 g de nitrogênio, e escore químico.

| AMINOÁCIDOS | ERVILHA | F.COMUM | F.CORDA | G.BICO | CASEÍNA | PADRÃO* |
|-------------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|
| ILE         | 4,4     | 4,8     | 4,5     | 4,5    | 5,2     | 4,2     |
| LEU         | 6,6     | 8,0     | 8,1     | 7,4    | 9,9     | 7,0     |
| LYS         | 7,1     | 6,6     | 6,8     | 7,0    | 7,9     | 5,1     |
| MET         | 0,9     | 1,0     | 1,5     | 1,3    | 2,9     |         |
| CYS (1/2)   | 0,3     | 0,9     | 0,9     | 1,0    | -       |         |
| SULF. TOT.  | 1,2     | 1,9     | 2,4     | 2,3    | 2,9     | 2,6     |
| PHE         | 5,3     | 5,1     | 6,6     | 6,3    | 5,7     |         |
| TYR         | 2,7     | 3,0     | 3,2     | 2,7    | 5,5     |         |
| AROM. TOT.  | 8,0     | 8,1     | 9,8     | 9,0    | 11,2    | 7,3     |
| THR         | 3,6     | 4,6     | 4,2     | 4,0    | 5,5     | 3,5     |
| VAL         | 5,8     | 6,4     | 4,8     | 4,4    | 7,1     | 4,8     |
| ARG         | 9,1     | 6,2     | 5,7     | 7,6    | 4,2     |         |
| HIS         | 2,2     | 2,6     | 3,1     | 2,1    | 3,1     |         |
| ALA         | 3,8     | 4,4     | 4,5     | 4,6    | 3,4     |         |
| ASP         | 9,8     | 10,0    | 14,4    | 11,8   | 8,4     |         |
| GLU         | 14,6    | 15,5    | 20,0    | 16,5   | 29,6    |         |
| GLY         | 3,6     | 4,0     | 4,7     | 4,3    | 2,2     |         |
| PRO         | 4,0     | 4,5     | 4,7     | 4,5    | 9,3     |         |
| SER         | 5,1     | 6,5     | 5,5     | 5,4    | 7,1     |         |
| ESCORE      | 46,2    | 73,1    | 92,3    | 88,5   | 111,5   |         |

\* Padrão teórico (N.A.S. 1980). 80

sulfurados, não procedemos determinação à parte, razão pela qual a Tabela 9 não traz os valores deste aminoácido.

A ervilha apresentou o menor teor de metionina e de sulfurados totais, seguida pelo feijão-comum; já o grão-de-bico e o feijão-de-corda apresentaram melhores teores. O cálculo dos escores resultou em mais baixo valor para a ervilha, que desta forma destacou-se dos demais grãos, os quais apresentaram escores mais altos, sendo o do feijão-de-corda e do grão-de-bico os mais elevados e próximos entre si. Estes dados confirmam o consenso quanto à característica comum entre as leguminosas acerca dos baixos teores de metionina (BLISS, 1972; BOULTER et alii, 1972; JAFFÉ & BRUCHER, 1974; KHAN et alii, 1979; SGARBIERI & WHITAKER, 1982; SOTELO et alii, 1987; KOCHHAR et alii, 1988), que neste trabalho foi o aminoácido limitante para os quatro tipos de grãos.

Para os demais aminoácidos essenciais, os teores encontrados estão em correspondência com a literatura para a ervilha e o feijão-comum (JAFFÉ & BRUCHER, 1974; EVANS & BOULTER, 1980), para o grão-de-bico (KHAN et alii, 1979; SOTELO et alii, 1987) e para o feijão-de-corda (BLISS, 1972; BOULTER et alii, 1972; KOCHHAR et alii, 1988).

Cumpre notar que, apesar da ampla utilização da composição em aminoácidos para avaliação da qualidade protéica, sendo inclusive aplicada para estimar o valor de outros indicadores, como Valor Biológico (BLOCK & MITCHELL, 1946; OSER, 1951) e Quociente de Eficiência Protéica, ou P.E.R (SELIGSON & MACKEY, 1984), o escore químico deve ser interpretado com

cautela. Neste trabalho determinamos a limitação dos aminoácidos sulfurados tendo como referência a composição padrão estabelecida pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, OU N.A.S.) de 1985. A nova versão recentemente publicada das Cotas Dietéticas Recomendadas (ibid, 1989) determina que o escore químico seja calculado com base nas recomendações de aminoácidos para faixas etárias específicas, que apresentam valores bastante próximos aos da composição padrão referida em 1985 (ver adendo 1), que aplica-se como referência sem a especificidade de faixa etária. Desta forma, entendemos que este procedimento é mais adequado às características deste trabalho, que usa o rato como modelo biológico. A tendência para a revisão da referência apresentada pela F.A.O. (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1973), bastante difundida para cálculo de escore químico, já acontecia por ocasião da publicação da nova versão para Necessidades de Energia e Proteínas (ibid, 1985), na qual as necessidades de aminoácidos diminuíram para as faixas etárias de 10 à 12 anos (exceto para triptofano) e adultos e aumentaram para lactentes (exceto para treonina); houve também o estabelecimento das necessidades para nova faixa etária, de 2 a 5 anos e a inclusão da histidina para adultos (ver Adendo 2). Apesar da adequação dos valores fornecidos em 1973 aos novos conceitos acerca da diminuição acelerada das necessidades de aminoácidos essenciais em relação às de proteínas a partir da infância, esta nova versão não modifica o padrão de referência para cálculo do escore químico. Em trabalho de 1987, Sarwar discute a procedência

de escores obtidos com diferentes padrões, e aplica a última recomendação da F.A.O. (1985) para a faixa etária de 2 a 5 anos (que não constava da versão anterior) como padrão de referência. Os padrões de referência divergem claramente quanto aos valores recomendados para aminoácidos sulfurados: o padrão adotado neste trabalho como referência (National Academy of Sciences, 1980), já propunha 26 mg de sulfurados por grama de proteína, enquanto o padrão da F.A.O. em vigor trazia 35 mg/g. As distorções decorrentes da metodologia analítica e do padrão adotado foram discutidas por Seligson e Mackey (1984) que sugerem a impropriedade da utilização exclusiva deste indicador para qualificar nutricionalmente uma proteína.

Com estas considerações, reafirma-se o fato de que o estabelecimento dos escores devem ser analisados também à luz dos resultados obtidos de outras formas, entre as quais, aquelas decorrentes de ensaios biológicos.

#### 4.2. Resultados obtidos dos ensaios biológicos.

##### 4.2.1. Ingestão e retenção de nitrogênio.

A Tabela 10 traz os dados referentes à ingestão, excreção e retenção de nitrogênio, determinados durante os quatro dias de balanço subsequentes à adaptação de 48 horas às dietas.

Dentre as leguminosas estudadas, a ervilha e o feijão-de-corda apresentaram as melhores retenções de

TABELA 10. Retenção de nitrogênio obtida por balanço de 4 dias após adaptação de 48 horas, com ratos Wistar previamente jejuados e alimentados com dieta contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico ou caseína como fonte protéica.

| TRATAMENTOS     | NITROGÊNIO (mg) * |        |          |          |
|-----------------|-------------------|--------|----------|----------|
|                 | INGERIDO          | FECAL  | URINÁRIO | RETIDO   |
| ERVILHA         | 960,82            | 196,97 | 137,75   | 624,48 a |
|                 | 114,81            | 29,13  | 36,33    | 110,51   |
| FEIJÃO-COMUM    | 788,17            | 226,4  | 121,63   | 440,14 b |
|                 | 122,21            | 58,54  | 32,46    | 86,9     |
| FEIJÃO-DE-CORDA | 816,80            | 168,57 | 69,66    | 578,59 a |
|                 | 153,41            | 61,81  | 17,62    | 98,32    |
| GRÃO-DE-BICO    | 421,90            | 99,25  | 66,32    | 232,36 c |
|                 | 29,44             | 23,79  | 11,48    | 57,62    |
| CASEÍNA         | 1077,70           | 58,32  | 166,98   | 852,40 d |
|                 | 221,49            | 20,02  | 8,00     | 158,94   |
| APROTÉICA       | 23,38             | 23,38  | 24,88    | _____    |
|                 | 2,61              | 9,75   | 5,53     |          |

\* Valores médios e desvios padrão para grupos de 6 animais.  
 Valores em uma coluna assinalados com a mesma letra não diferem  
 ( $p < 0,05$ ).

nitrogênio, sem diferença significativa, mas ambas inferiores à da dieta controle (caseína) que apresentou, conforme esperado, a melhor retenção. Seguem-se o feijão-comum com valor intermediário e o grão-de-bico, com a pior retenção. Apesar de ser considerado por alguns autores como possível sucedâneo ao extrato hidrossolúvel de soja em formulações para alimentação infantil sem lactose (SOTELO et alii, 1987a; 1987b), neste trabalho o grão-de-bico apresentou a mais baixa retenção de nitrogênio, o que não o habilita para fins de crescimento.

Com a variação de peso no período, pôde-se estabelecer uma correlação positiva entre os valores de retenção de nitrogênio e ganho de peso, expressa por uma reta com coeficiente de correlação de 0,7616 ( $p < 0,01$ ) e que pode ser vista na Figura 4. Esta correlação mostra que dietas com características bastante diversas como a controle (com caseína como fonte protéica), dietas com leguminosas e mesmo a dieta aprotéica, determinam o mesmo padrão de ganho de peso, dependente da retenção de nitrogênio.

O segundo ensaio confirmou os valores de ingestão de dieta e excreção de nitrogênio fecal obtidos no primeiro ensaio. Lamentavelmente, algumas determinações de nitrogênio urinário neste ensaio confirmativo foram perdidas, razão pela qual não se tem para comparação os indicadores Valor Biológico e Utilização Líquida da Proteína, que serão abordados adiante. A Tabela 12 traz os dados obtidos neste ensaio.

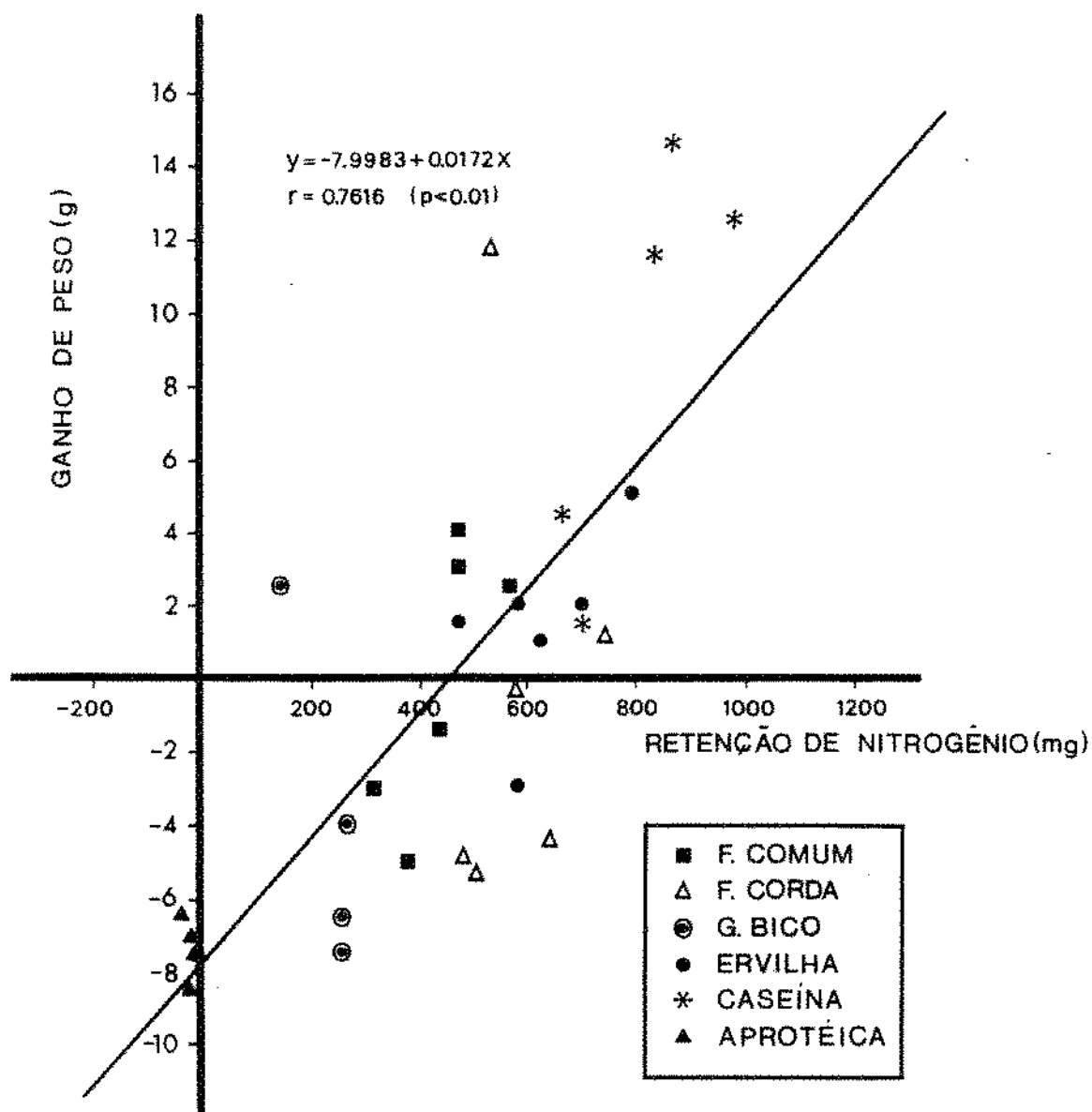


Figura 4. Regressão linear obtida para ganho de peso em função da retenção de nitrogênio, para ratos Wistar alimentados com dietas contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico ou caseína como fonte protéica e dieta aprotéica, em balanço de nitrogênio de 4 dias após jejum e 48 horas de adaptação às dietas. Valores individuais por animal.

#### 4.2.2. Excreção de nitrogênio total e de $^{15}\text{N}$ .

A coleta de fezes efetuada a cada 24 horas permitiu acompanhar a dinâmica de excreção fecal. A Figura 5 traz as percentagens de nitrogênio fecal determinadas nestes intervalos de tempo. Para as dietas de ervilha, feijão-comum e feijão-de-corda, as excreções percentuais de nitrogênio fecal apresentaram elevação da primeira à terceira dosagem (24 à 72 horas após o início do consumo da dieta), a partir de quando estabilizaram-se, não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Esta estabilização foi comum também às dietas controle e aprotéica, que diferiram das anteriores pelo fato de que a estabilização ocorreu após queda das percentagens. A dieta de grão-de-bico diferiu notadamente das demais leguminosas, desde que em todas as determinações apresentou valores crescentes que só passaram a não diferir com 120 horas.

O resultados da determinação das percentagens do isótopo nas fezes nestes mesmos intervalos estão demonstrados na Figura 6 (que traz também as percentagens de marcação das dietas e a abundância natural do isótopo), e apresentam estabilização sem diferirem significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir de 72 horas, que ocorre simultaneamente à estabilização encontrada para a excreção de nitrogênio total para as dietas de ervilha, feijão-de-corda e feijão-comum. Este comportamento não foi o mesmo para a dieta de grão-de-bico, que apresentou elevação continua da primeira à última determinação.

Estas observações confirmam os dados encontrados por

## NITROGÊNIO FECAL

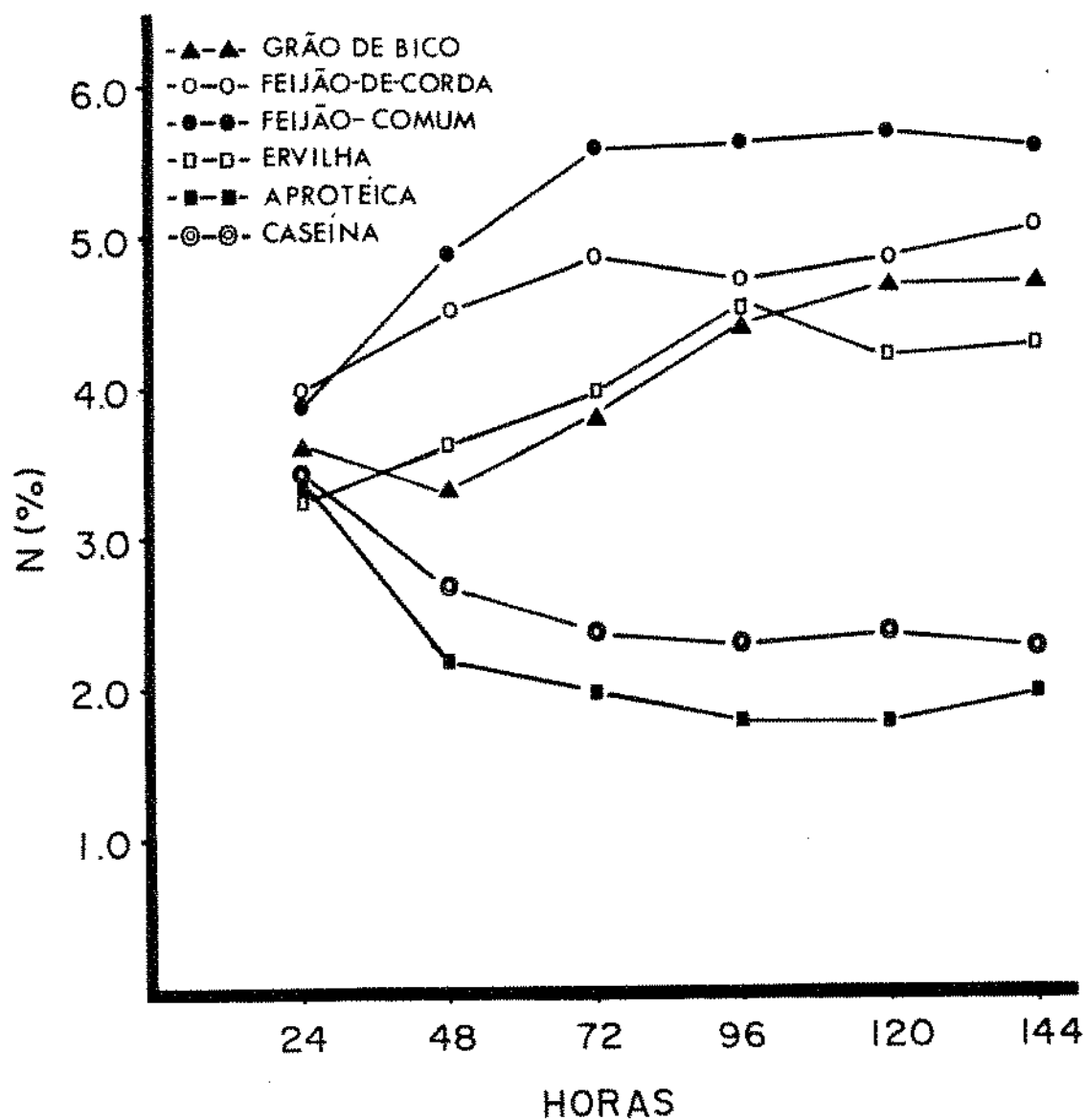


Figura 5. Excreção de nitrogênio fecal por dia para ratos Wistar alimentados com dietas contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda ou grão-de-bico como fonte protéica, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio. Valores médios para grupos de 6 ou 4 animais (grão-de-bico).

## DILUIÇÃO ISOTÓPICA DE $^{15}\text{N}$ NAS FEZES

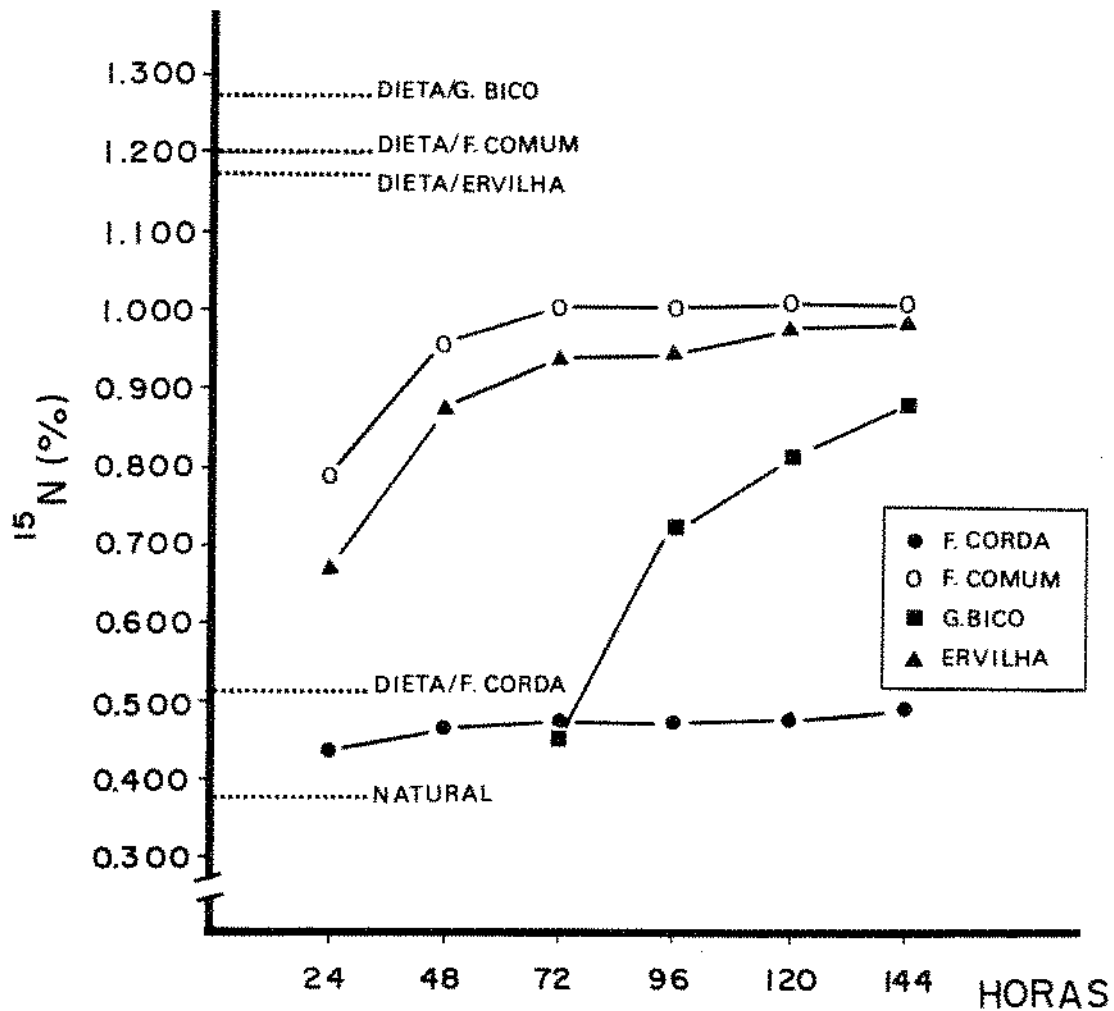


Figura 6. Excreção do isótopo nas fezes por dia, para ratos Wistar alimentados com dieta contendo ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda ou grão-de-bico como fonte protéica, marcadas com  $^{15}\text{N}$ , durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço. Valores médios para grupos de 6 ou 4 animais (grão-de-bico).

Oliveira (1986) que não encontrou diferença significativa para a excreção de nitrogênio fecal e do isótopo a partir de 48 horas para dietas com feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, cultivar Carioca 80) cozido marcado com  $^{15}\text{N}$ . Na verdade, a expectativa que o comportamento referido pelo autor quanto às excreções fecais de nitrogênio e do isótopo se reproduzisse para outras leguminosas, o que efetivamente aconteceu, foi determinante para o planejamento do experimento, que previu um período de jejum seguido de 48 horas de adaptação às dietas para então ser iniciado o ensaio de balanço, conduzido após a normalização dos níveis de isótopo nas fezes. Este cuidado visou evitar a interferência de níveis crescentes de isótopo nas fezes sobre os cálculos para obtenção dos valores de nitrogênio endógeno, que serão empregados para a correção dos indicadores de avaliação protéica.

A excreção diferenciada do isótopo apresentada pelo grão-de-bico pode ser entendida uma vez que, em função da pequena quantidade de dieta disponível, o que por sua vez foi determinado pelo baixo rendimento na fase de produção deste grão, os animais foram adaptados à dieta com material não marcado. Desta forma, ao iniciar a ingestão de dieta marcada, houve grande diluição do isótopo com o nitrogênio residual presente no sistema digestivo dos animais nas primeiras 48 horas.

#### 4.2.3. O nitrogênio de origem endógena.

A Tabela 11 traz os valores de nitrogênio endógeno fecal

TABELA 11. Nitrogênio de origem endógena excretado por ratos Wistar previamente jejuados e alimentados com dieta de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico marcados com 15 N durante balanço de quatro dias após adaptação de 48 horas.

| TRATAMENTO      | NITROGÊNIO URINÁRIO * |         | NITROGÊNIO FECAL * |          |
|-----------------|-----------------------|---------|--------------------|----------|
|                 | %                     | mg      | %                  | mg       |
| ERVILHA         | 37,78 a               | 52,19 a | 26,69 a            | 52,42 a  |
|                 | 2,73                  | 14,39   | 0,95               | 7,48     |
| FEIJÃO-COMUM    | 42,45 a               | 51,15 a | 22,40 a            | 49,87 ab |
|                 | 4,23                  | 12,47   | 4,47               | 10,58    |
| FEIJÃO-DE-CORDA | 40,28 a               | 28,77 b | 24,45 a            | 38,85 b  |
|                 | 9,31                  | 10,07   | 2,95               | 10,61    |
| GRÃO-DE-BICO#   | 71,65 b               | 47,57 a | 61,45 b            | 58,31 a  |
|                 | 4,28                  | 9,13    | 5,12               | 9,70     |
| APROTÉICA       | 100,00                | 24,88 b | 100,00             | 23,38 c  |
|                 |                       | 5,53    |                    | 9,75     |

\* Valores médios e desvios padrão para grupos de 6 animais.

# Valores obtidos após adaptação com dieta não marcada.

Valores em uma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem ( $p < 0,05$ ).

TABELA 12. Nitrogênio absorvido por ratos Wistar previamente jejuados e valores de Digestibilidade de proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda e caseína obtidos em balanço de quatro dias, após adaptação de 48 horas. Segundo ensaio.

| TRAT.     | NITROGÊNIO (mg) * |        |         |        | DIGESTIBILIDADE % * |        |        |
|-----------|-------------------|--------|---------|--------|---------------------|--------|--------|
|           | ING.              | FECAL  | ABSORV. | ENDOG. | APAR.               | VERD.  | REAL   |
|           |                   |        |         |        |                     |        |        |
|           |                   |        |         | FECAL  |                     |        |        |
| ERVILHA   | 1056,97           | 192,57 | 864,40a | 53,15a | 82,10a              | 82,98a | 87,75a |
|           | 164,79            | 70,89  | 120,98  | 12,04  | 4,56                | 3,43   | 2,82   |
| F. COMUM  | 765,92            | 226,18 | 539,70b | 51,92a | 70,58b              | 73,42b | 77,46b |
|           | 187,92            | 60,58  | 131,13  | 10,03  | 2,63                | 2,89   | 2,11   |
| F. CORDA  | 890,77            | 198,78 | 691,98b | 46,02a | 77,66c              | 80,18a | 82,93c |
|           | 116,31            | 25,66  | 91,99   | 7,21   | 0,92                | 1,05   | 1,18   |
| CASEÍNA   | 1069,27           | 51,38  | 974,50a | —      | 95,23d              | 97,22d | —      |
|           | 196,72            | 13,47  | 157,27  |        | 0,70                | 0,91   |        |
| APROTÉICA | 19,40             | —      | —       | 20,70b | —                   | —      | —      |
|           | 3,21              |        |         | 4,32   |                     |        |        |

\* Valores médios e desvios padrão para grupos de 6 animais.

Valores em uma coluna assinalados com a mesma letra, e em uma linha sublinhados com o mesmo traço, não diferem ( $p < 0,05$ ).

e urinário obtidos através do uso dos valores de excreção do isótopo, bem como decorrentes da dieta aprotéica. Pôde-se observar que percentualmente não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos tanto para o nitrogênio endógeno excretado pela urina como pelas fezes. A diferença percentual assinalada na tabela para o grão-de-bico deve ser analisada considerando-se o procedimento diferenciado adotado com esta leguminosa durante a fase de adaptação, e pode ser justificada pela presença de material residual não marcado que contribuiu para a elevação dos valores endógenos.

Já em relação às quantidades de nitrogênio, a dieta de feijão-de-corda apresentou a menor excreção de nitrogênio endógeno urinário, diferindo significativamente das demais ( $p < 0,05$ ), e sendo semelhante à da dieta aprotéica. Da mesma forma, esta leguminosa diferenciou-se das demais quanto à quantidade de nitrogênio endógeno fecal, apresentando a menor eliminação, mas já não se assemelhando à dieta aprotéica, como no caso do nitrogênio endógeno urinário.

É interessante notar que as excreções de material endógeno pelas fezes referentes às dietas de leguminosas são, para as dietas de ervilha, feijão-comum e grão-de-bico, superiores em duas a duas vezes e meia às aquelas determinadas pelo grupo em dieta aprotéica, o que foi confirmado pelo segundo ensaio (conforme dados expostos na Tabela 12). Estes valores estão de acordo com os encontrados por Oliveira e Sgarbieri (1984) que trabalharam com dietas de feijão cozido e determinaram a excreção de material endógeno através do uso de

# ERVILHA (*P. sativum*)

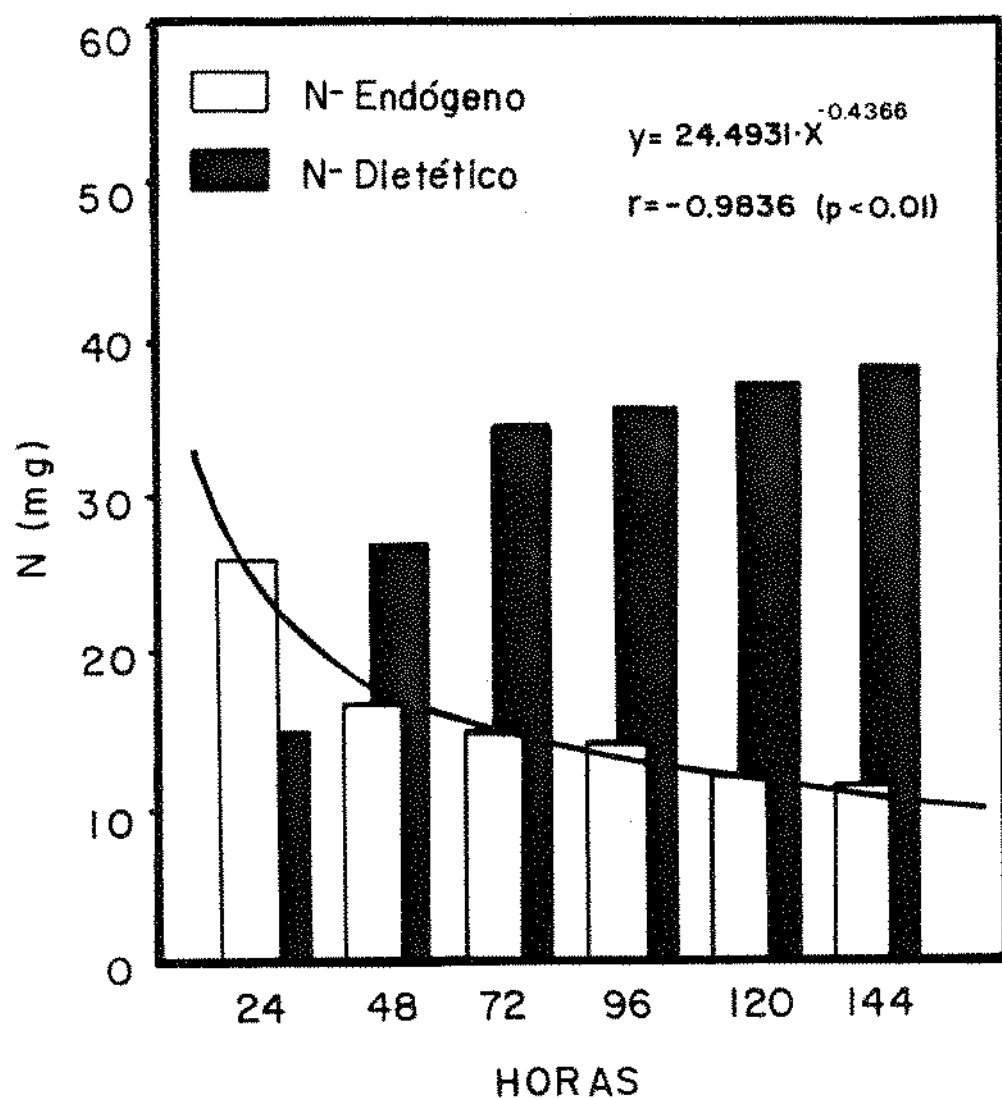


Figura 8. Regressão potencial para quantidade de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de ervilha como fonte protéica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupos de 6 animais, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio.

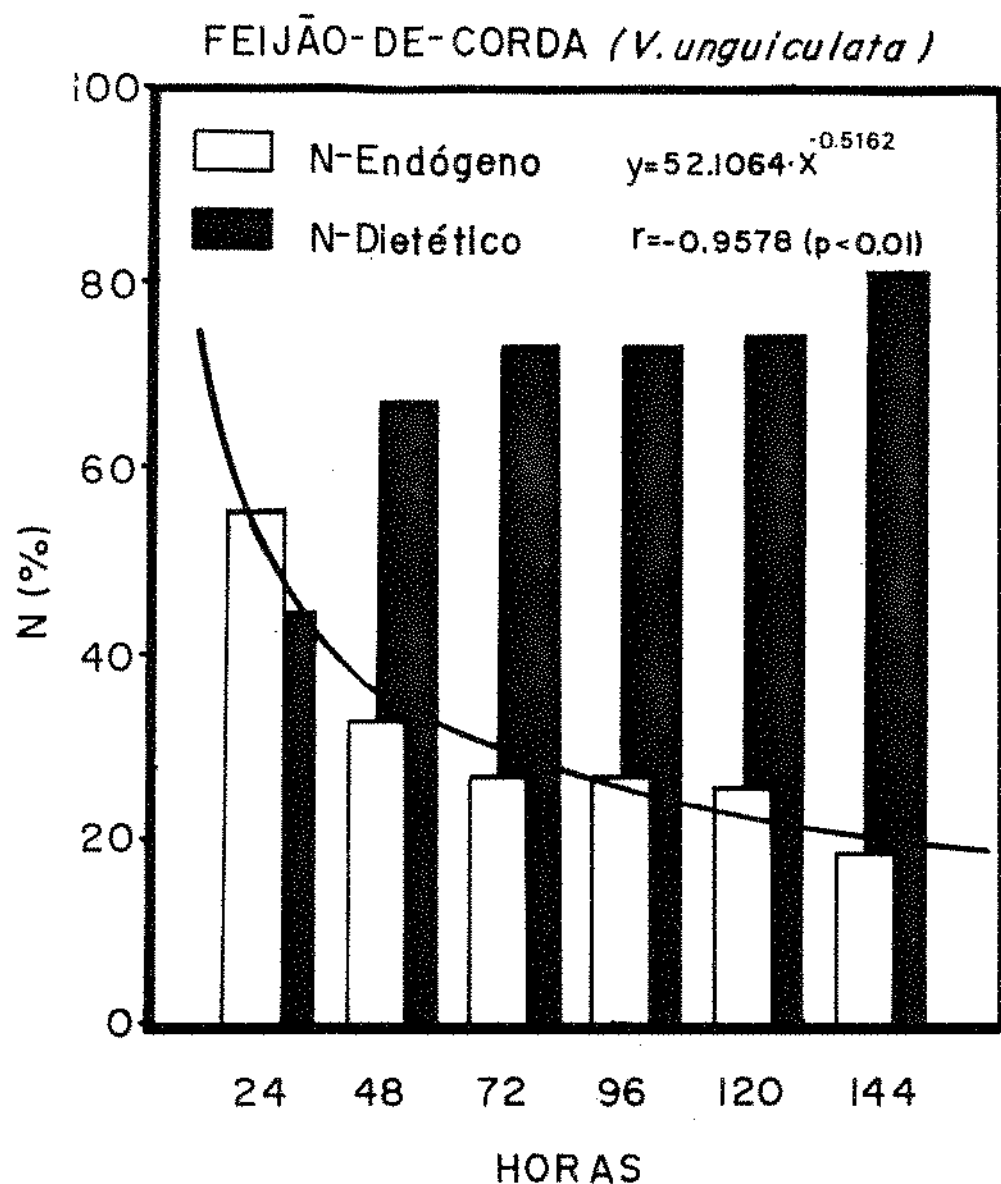


Figura 9. Regressão potencial para percentagem de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de feijão-de-corda como fonte protéica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupos de 6 animais, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio.

# FEIJÃO-DE-CORDA (*V. unguiculata*)

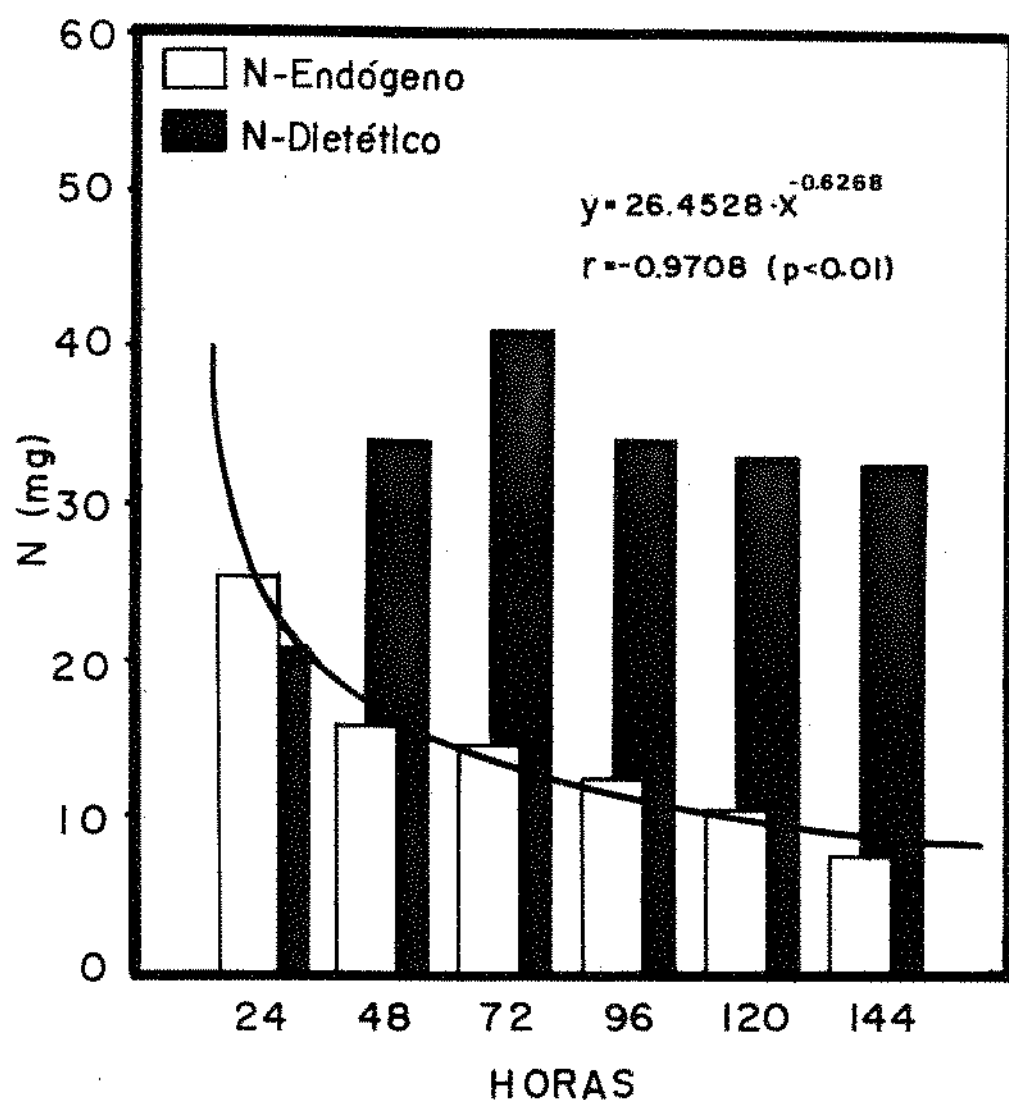


Figura 10. Regressão potencial para quantidade de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de feijão-de-corda como fonte protéica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupos de 6 animais, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio.

# FEIJÃO-COMUM (*P. vulgaris*)

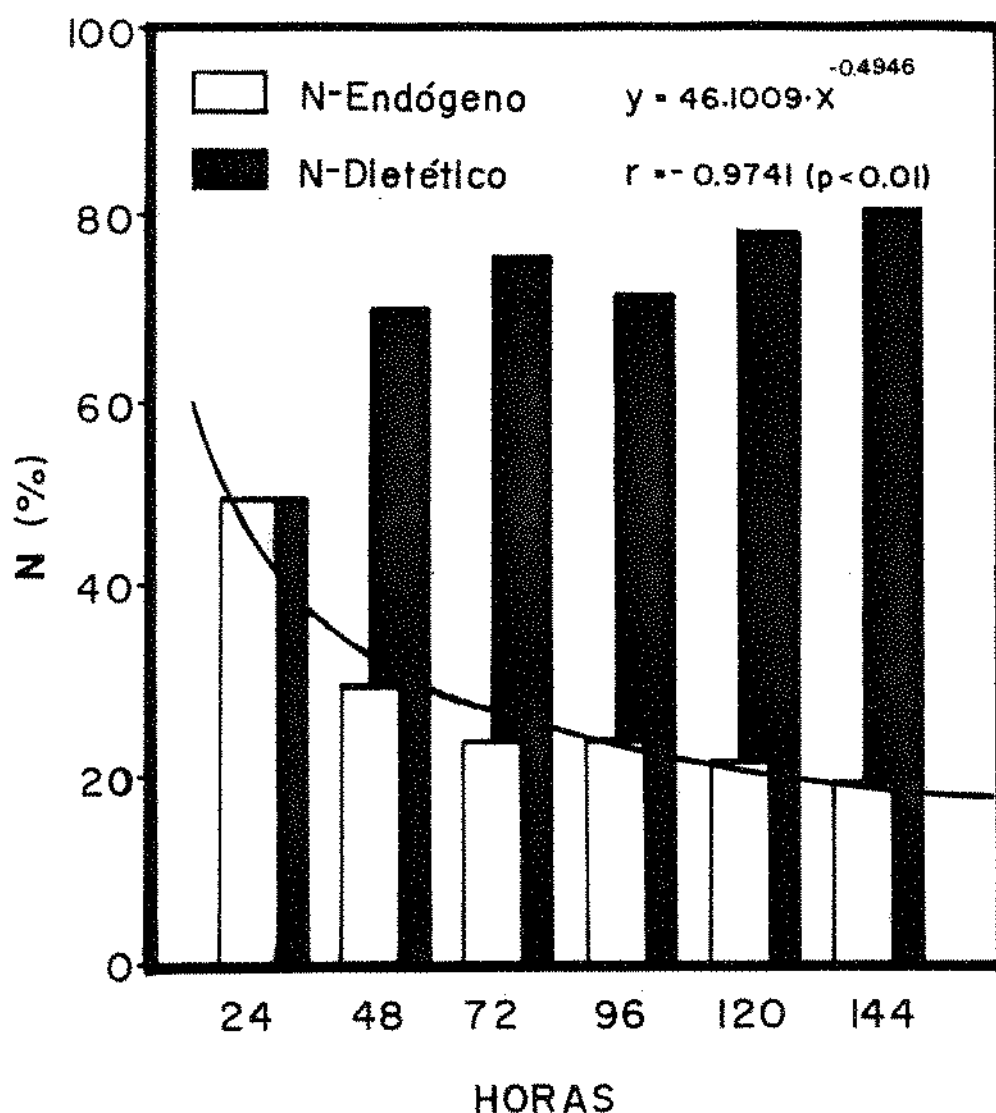


Figura 11. Regressão potencial para percentagem de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de feijão-comum como fonte proteica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupos de 6 animais, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio.

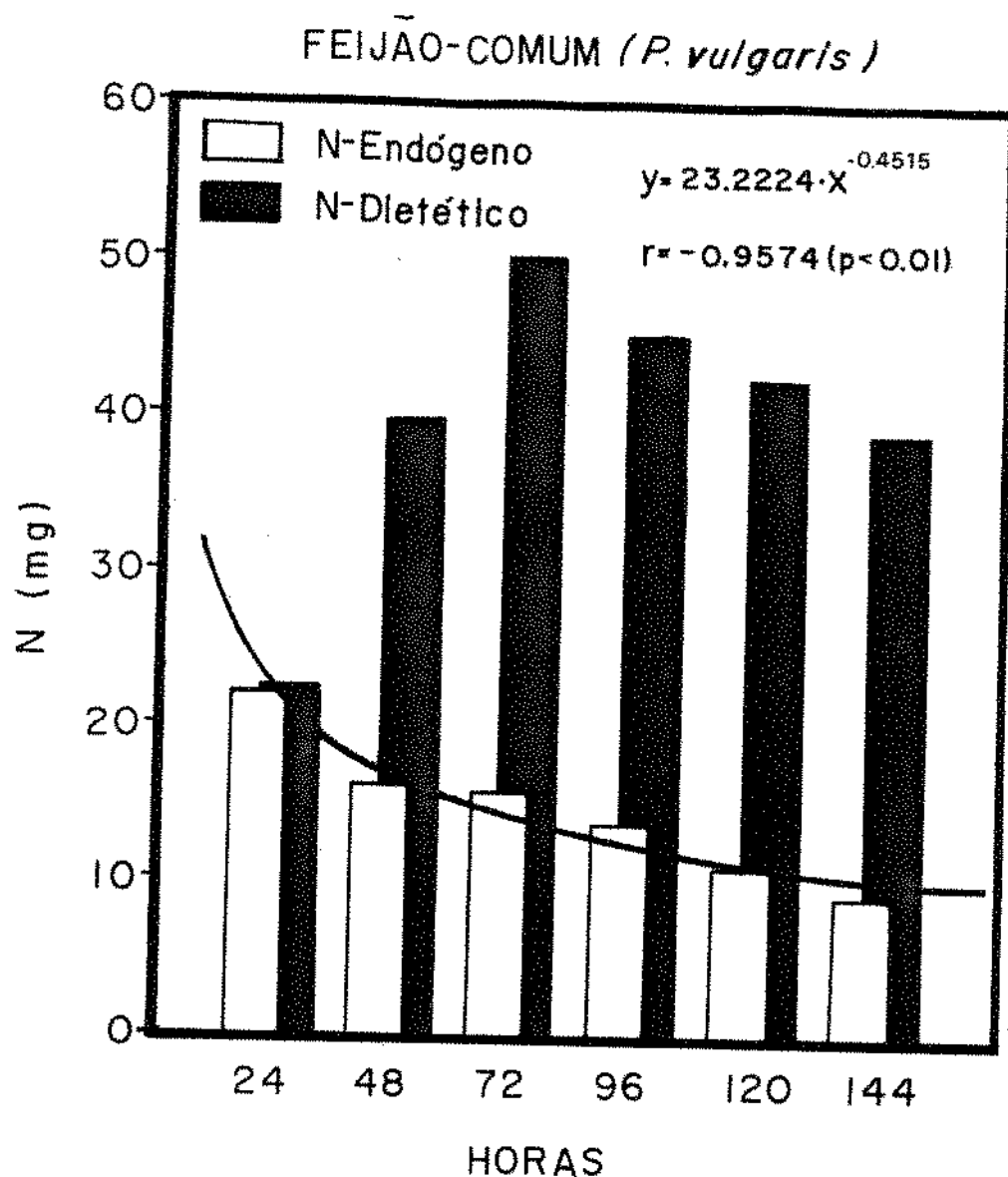


Figura 12. Regressão potencial para quantidade de nitrogênio endógeno fecal diária em função do tempo, para ratos Wistar alimentados com dieta de feijão-comum como fonte protéica, marcada com  $^{15}\text{N}$ . Valores médios para grupos de 6 animais, durante 48 horas de adaptação e 4 dias de balanço de nitrogênio.

este comportamento exprime a adaptação do animal à dieta, traduzido por minimização das perdas corporais fisiológicas envolvidas no processo de digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes. A utilização de um período de adaptação precedente ao início de ensaios de balanço já era considerada em 1935, o que pode ser constatado pelo artigo publicado naquele ano por Chick e colaboradores, que expressa sua incerteza quando a duração do mesmo, "havendo dúvida se um período preparatório de 2-3 dias seria longo o suficiente para eliminar os efeitos da dieta precedente (...)", e vem sendo prática em alguns trabalhos (BERGNER et alii, 1984; KEITH & BELL, 1988). Mais recentemente, o conceito de adaptação foi aprofundado com a constatação de que a habilidade para manutenção da homeostase depende de mecanismos compensatórios que permitem a adequação do organismo vivo a alterações das condições em que vive, dentre as quais, o aporte nutricional, o que pode ser ilustrado pela redução do "turnover" de proteína consequente a quadros de desnutrição. A soma das mudanças do metabolismo de proteínas e aminoácidos determina um estado de "economia" de nitrogênio em todo o organismo (STEFFEE et alii, 1976; YOUNG, 1987). Acreditamos que o "steady state" demonstrado pelas regressões a partir de 48 horas pode ser explicado por um mecanismo semelhante, cuja complexidade escapa aos objetivos deste trabalho.

#### 4.2.4. Indicadores de qualidade protéica.

As Tabelas 13, 14 e 15 trazem os valores de cada indicador (Digestibilidade, Valor Biológico e Utilização Líquida

TABELA 13. Valores de digestibilidade de proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, obtidos por balanço de nitrogênio de quatro dias após adaptação de 48 horas com ratos Wistar previamente jejuados.

| TRATAMENTO      | DIGESTIBILIDADE % * |               |                |
|-----------------|---------------------|---------------|----------------|
|                 | APARENTE            | VERDADEIRA    | REAL           |
| ERVILHA         | 79,43+-2,73 a       | 81,89+-2,67 a | 84,94+-2,10 a  |
| FEIJÃO COMUM    | 71,24+-6,05 b       | 74,23+-6,11 b | 77,66+-5,02 b  |
| FEIJÃO-DE-CORDA | 79,85+-5,17 a       | 82,84+-5,56 a | 84,66+-4,64 a  |
| GRÃO-DE-BICO    | 76,64+-4,41 a       | 82,25+-4,66 a | 90,48+-3,35 c# |
| CASEÍNA         | 94,58+-1,54 c       | 96,83+-1,65 c | _____          |

\* Valores médios e desvios padrão para grupos de 6 animais.

# Indicador calculado após adaptação com dieta não marcada.

Valores em uma coluna assinalados com a mesma letra, e em uma linha sublinhados com o mesmo traço, não diferem ( $p < 0,05$ ).

TABELA 14. Valor Biológico de proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, obtido por balanço de nitrogênio de quatro dias após adaptação de 48 horas com ratos Wistar previamente jejuados.

| TRATAMENTO      | VALOR BIOLÓGICO % * |               |                 |
|-----------------|---------------------|---------------|-----------------|
|                 | APARENTE            | VERDADEIRO    | REAL            |
| ERVILHA         | 81,72+-5,27 ac      | 85,49+-4,94 a | 89,41+-2,97 ab  |
| FEIJÃO COMUM    | 78,23+-4,94 c       | 83,50+-4,67 a | 88,50+-2,82 b   |
| FEIJÃO-DE-CORDA | 89,23+-2,66 b       | 93,39+-2,64 b | 93,97+-1,61 c   |
| GRÃO-DE-BICO    | 79,48+-2,88 ac      | 88,30+-2,91 a | 92,83+-5,41 ac# |
| CASEÍNA         | 83,98+-4,85 ab      | 86,81+-4,95 a | _____           |

\* Valores médios e desvios padrão para grupos de 6 animais.

# Indicador calculado após adaptação com dieta não marcada.

Valores em uma coluna assinalados com a mesma letra, e em uma linha sublinhados com o mesmo traço, não diferem ( $p < 0,05$ ).

TABELA 15. Valores de NPU para proteína de ervilha, feijão-comum, feijão-de-corda, grão-de-bico e caseína, obtidos por balanço de nitrogênio de 4 dias após adaptação de 48 horas, com ratos Wistar previamente jejuados.

| TRATAMENTO      | APARENTE       | NPU % *<br>VERDADEIRA | REAL           |
|-----------------|----------------|-----------------------|----------------|
| ERVILHA         | 64,97+-5,67 a  | 70,06+-5,52 a         | 75,96+-3,62 a  |
| FEIJÃO-COMUM    | 55,67+-5,44 b  | 61,96+-5,34 b         | 68,71+-4,66 b  |
| FEIJÃO-DE-CORDA | 71,43+-6,02 a  | 77,43+-6,81 cd        | 79,59+-5,06 ac |
| GRÃO-DE-BICO    | 60,94+-4,68 ab | 72,65+-5,23 ac        | 84,11+-7,66 c* |
| CASEÍNA         | 79,37+-3,72 c  | 84,02+-4,16 d         |                |

\* Valores médios e desvios padrão para grupos de 6 animais.

# Indicador calculado após adaptação com dieta não marcada.

Valores em uma coluna assinalados com a mesma letra, e em uma linha sublinhados com o mesmo traço, não diferem ( $p < 0,05$ ).

da Proteína, respectivamente) aparentes e verdadeiros, bem como os obtidos através do uso da diluição isotópica, chamados reais (OLIVEIRA, 1986). As dietas de ervilha, feijão-de-corda e grão-de-bico não diferiram ( $p < 0,05$ ) para os indicadores aparente e verdadeiro de digestibilidade, e o mais alto valor encontrado para o indicador real do grão-de-bico pode ser explicado pela superestimação do material de excreção endógena, já referida. O feijão-comum apresentou os valores mais baixos para os três tipos de indicador. A análise horizontal (entre tipos de indicador para um mesmo tratamento), demonstra que apenas para a dieta de ervilha ocorre diferença entre o indicador real do aparente, uma vez que para a de feijão-comum e feijão-de-corda não há diferença entre os três tipos de indicador. O segundo ensaio, que permitiu o cálculo da Digestibilidade, trouxe valores semelhantes deste indicador para os mesmos tratamentos. Contudo, apresentou resultados bastante mais homogêneos dentro dos grupos, o que determinou a ocorrência de desvios-padrão menores do que os obtidos no primeiro ensaio (ver Tabela 12). Neste caso, ao contrário do que aconteceu no primeiro ensaio, os valores de Digestibilidade real passaram a diferir dos aparentes, para todos os tratamentos. Nota-se que, embora os dois ensaios tenham apresentado valores que se correspondem, o que valida o ensaio confirmativo, a análise estatística permite interpretações diferentes quanto à correção da excreção fecal pela técnica da marcação isotópica, o que pode ser atribuído à diferença de magnitude entre os desvios-padrão dos dois ensaios.

Quanto ao Valor Biológico, destaca-se o desempenho do feijão-de-corda, com valores superiores aos da dieta com caseína, da qual diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ). As dietas de ervilha e de grão-de-bico apresentaram valores semelhantes ao da dieta de caseína. O feijão-comum apresentou os mais baixos valores entre os aparentes e verdadeiros, sendo, contudo, semelhante à ervilha quanto ao Valor Biológico real. Apesar das diferenças entre aparentes e verdadeiros para feijão-comum, feijão-de-corda e grão-de-bico, os indicadores reais não diferiram dos verdadeiros.

Para Utilização Líquida da Proteína, novamente destaca-se o feijão-de-corda, que chega a não diferir da dieta controle para NPU verdadeiro. Em seguida a dieta de ervilha e de grão-de-bico apresentam os melhores valores e o feijão-comum, os mais baixos. Comparando-se entre aparente, verdadeiro e real para um mesmo tratamento, nota-se a semelhança entre aparentes e verdadeiros e entre estes e reais para ervilha e feijão-comum, e semelhança entre os três para feijão-de-corda. Para grão-de-bico, os três tipos diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ).

Existe grande diversidade em relação aos registros de valores de indicadores da qualidade protéica para cada um destes grãos, decorrentes de fatores já referidos neste trabalho, como aqueles determinados por condições de cultivo dos vegetais, características específicas de cultivares, e mesmo condições experimentais. Assim, sendo este um trabalho comparativo, onde as quatro leguminosas foram cultivadas sob mesmas condições

agriculturáveis quanto à solo, clima, adubação e irrigação, e considerando a uniformidade de procedimentos quanto ao preparo de dietas, origem e manipulação de animais e métodos analíticos, não cabe outra discussão senão quanto ao desempenho de cada grão em relação aos demais deste estudo.

O uso da marcação isotópica para correção dos indicadores de qualidade protéica trouxe valores superiores àqueles obtidos por correção através de dieta aprotéica, devido à eliminação da interferência do material endógeno urinário e fecal encontrado em maior quantidade em decorrência à ação das leguminosas. A obtenção de valores elevados para estes indicadores com dietas de leguminosas através do uso de isótopos foi referida por Oliveira e Sgarbieri (1986a e 1986b) aplicados de duas formas distintas. No primeiro trabalho, os autores mediram a radioatividade nas fezes e urina de ratos que receberam  $^{14}\text{C}$ -glicina por injeção intraperitoneal e observaram valores de Digestibilidade e Valor Biológico "reais" superiores aos verdadeiros tanto para a dieta de feijão cozido quanto para a de caseína. Encontraram também Valores Biológicos sem diferença significativa entre as duas dietas. Este fato demonstra que mesmo para uma fonte protéica purificada e usada como padrão, existe perda de material endógeno superior àquela quantificada pela dieta aprotéica. Isto pode ser atribuído à influência que a presença de alimento protéico no sistema digestivo exerce sobre as secreções enzimáticas, como demonstrado por Roy e colaboradores (1967), indicando que também aqui, a correção pela dieta aprotéica não é satisfatória. Na

segunda forma de aplicação do isótopo feita por Oliveira e Sgarbieri (1986b), os autores mediram a excreção de  $^{15}\text{N}$  nas fezes e urina de ratos alimentados com dietas de feijão marcada com o isótopo. Calculando a quantidade de material endógeno eliminada, encontraram valores de Digestibilidade e Valor Biológico "reais" superiores aos verdadeiros.

Apesar do grande volume de informações sobre a influência de leguminosas cruas sobre a excreção de nitrogênio fecal decorrente da presença de fatores antinutricionais (SGARBIERI et alii, 1979; SGARBIERI & WHITAKER, 1982), os mecanismos pelos quais ocorre aumento da excreção de material endógeno decorrente da ingestão de leguminosas cozidas ainda não são conhecidos (FAIRWEATHER-TAIT et alii, 1983; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a). Acreditamos que seja possível, através da técnica da marcação isotópica, estabelecer qual a influência específica que cada grupo de alimentos exerce sobre a fisiologia do aparelho digestivo e, desta forma, caracterizar melhor seu valor nutricional, a fim de otimizar o aproveitamento das dietas que comporão. A hipótese de que esta influência pode ser diferente entre os alimentos fica clara também no artigo de Bergner e colaboradores (1984), trabalhando também com  $^{15}\text{N}$ . Este autor encontrou aumento da excreção de nitrogênio endógeno em dietas com isolados protéicos de feijão em relação a dieta de caseína, em menores proporções do que o encontrado neste trabalho com grãos integrais. No mesmo trabalho, o trigo integral causou excreção de material endógeno inferior ao isolado protéico de feijão e superior ao da caseína, diferindo

significativamente de ambos.

Considerando-se que a síntese e o "turnover" de proteína envolvem considerável aporte energético (STEFFEE et alii, 1976), e que os alimentos apresentam ação diferenciada sobre o sistema digestivo, entendemos ser de grande interesse para o estudo da nutrição o conhecimento das implicações decorrentes da ingestão dos diversos alimentos sobre a economia energético-protéica, principalmente para o estabelecimento de regimes alimentares terapêuticos.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido o trabalho, pôde-se concluir que:

5.1. Entre as leguminosas estudadas, destaca-se o desempenho da ervilha e do feijão-de-corda, pela elevada retenção de nitrogênio nos animais e elevados valores de Digestibilidade, sendo que este último apresentou também o melhor Valor Biológico e Utilização Líquida de Proteína.

5.2. Após 48 horas do início da alimentação, os animais apresentaram-se adaptados às dietas, o que foi indicado pela excreção regular de material endógeno a partir de então. A adaptação referida manifestou-se por diminuição gradual e constante das percentagens e quantidades de nitrogênio endógeno, sugerindo um mecanismo de otimização das perdas fisiológicas envolvidas no processo de digestão e absorção. A progressiva diminuição traduziu-se por uma regressão potencial negativa forte, com coeficientes de correlação sempre superiores a 0,9500 ( $p < 0,01$ ).

5.3. A utilização da técnica de marcação isotópica para determinação do nitrogênio de origem endógena, demonstrou que as leguminosas cozidas causam acentuada perda de material nitrogenado, atingindo mais do que duas vezes aquela determinada pela dieta aprotéica; apesar disto, a correção dos indicadores de qualidade protéica pela aplicação destes valores, deve ser usada com reserva, uma vez que nem sempre diferiram daqueles obtidos através da correção por esta dieta ( $p < 0,05$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-RAHMAN, A. Y. Effect of cooking on tryptophan, basic amino acids, protein solubility and retention of some vitamins in two varieties of chick pea. *Food Chemistry*, Barking, 11:139-43, 1983.
2. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. EXPERIMENTAL ANIMAL NUTRITION COMMITTEE. Guidelines for describing diets for experimental animals. *Journal of Nutrition*, Bethesda, 114(1):15-6, 1984.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 12 ed. HORWITZ, W. ed. Washington, 1975. p.857.
4. \_\_\_\_\_. 1980. p.211.
5. BECKMAN INSTRUMENTS, INC. Beckman 118/119 BL, 118/119 CL amino acid analysers. *Instruction manual*. Palo Alto, 1977.
6. BENDER, A. E. & DOELL, B. H. Biological evaluation of proteins: a new aspect. *The British Journal of Nutrition*, Cambridge, Great Britain, 11:140-48, 1957.

7. BENDER, F. E.; DOUGLAS, L.W.; KRAMER, A. **Statistical methods for food and agriculture.** Westport, Avi Publishing Company, Inc., 1982. p. 91-4.
8. BENDER, A. E. & MOHAMMADIHA, H. Low digestibility of legume nitrogen. **The Proceedings of the Nutrition Society,** Cambridge, Great Britain, 14(2):66A, 1981.
9. BERGNER, H.; SEIDLER, W.; SIMON, O.; SCHMANDKE, H. Digestibility and dietary quality of non acetylated and acetylated *Vicia faba* proteins in maintenance. **Annals of Nutrition and Metabolism,** Basel, 28(3):156-63, 1984.
10. BIER, D. M. & MATHEWS, D. E. Practical advantages of gas chromatography-mass spectrometry for stable isotope measurement in biological samples. In: WATERLOW, J. C. & STEPHEN, J. M. ed. **Nitrogen metabolism in man.** London, Applied Science Publishers, 1981. p.289-94.
11. BIER, D. M. & MATTHEWS, D. E. Stable isotope tracer methods for in vivo investigations. **Federation Proceedings,** Washington, 41(10):2679-85, 1982.

12. BIRENDER, K.; SONI, G. L.; SINGH, R. Nutritional evaluation of gram (*Cicer arietinum*) varieties. *Human Nutrition: Food Sciences and Nutrition*, London, 41 F(2):121-28, 1987.
13. BLAXTER, K. L. & WOOD, W. A. The nutrition of the young ayrshire calf. I. The endogenous nitrogen and basal energy metabolism of the calf. *The British Journal of Nutrition*, Cambridge, Great Britain, 5(II):11-25, 1951.
14. BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biological Physiology*, Ottawa, 37:911-17, 1959.
15. BLISS, F. A. Cow peas in Nigeria. In: *Nutritional improvement of food legumes by breeding*. Protein Advisory Group of the United Nations System. Proceedings. FAO Symposium, Rome, 1972. p. 151-7.
16. BLOCK, R. J. & MITCHELL, H. H. The correlation of the amino acid composition of proteins with their nutritive value. *Nutrition Abstracts and Reviews*, Farnham Royal, 16(2):249-78, 1946.

17. BOULTER, D.; EVANS, I. M.; THOMPSON, A.; YARWOOD, A. The amino acid composition of *Vigna unguiculata* (cow-pea) meal in relation to nutrition. In: Nutritional improvement of food legumes by breeding. Protein Advisory Group of the United Nations System. Proceedings. FAO Symposium, Rome, 1972. p. 205-15.
18. BOSSHARDT, D. K. & BARNES, R. H. The determination of metabolic fecal nitrogen and protein digestibility. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 31:13-21, 1946.
19. BRAGA, N. R. et alii. Cultivar de grão-de-bico IAC-Marrocos. Instituto Agronômico. Campinas, 1989. (Folheto).
20. BRAGA, N. R. & BULISANI, E. A. Grão-de-bico. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Instruções agrícolas para o estado de São Paulo. JORGE, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; ARANHA, E. ed.. Campinas, 1990. p. 117.
21. BREMNER, J. M. Isotope ratio analysis of nitrogen in nitrogen 15 tracer investigations. In: C.A. BLACK; D. D. EVANS; L. E. ENSMINGER; F. E. CLARK ed.. *Methods of soil analysis*. 2 v., 1965. p. 1256-86.

22. BRESSANI, R.; ELIAS, L. G.; MOLINA, M. R. Estudios sobre la digestibilidad de la proteina de varias especies de leguminosas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Guatemala, 37(2):215-31, 1977.
23. BRESSANI, R.; ELIAS, L. G. Relación entre la digestibilidad y el valor proteínico del frijol comun (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Guatemala, 34(1):189-97, 1984.
24. BRESSANI, R. & ELIAS, L. G. The problem of legume protein digestibility. In: *Nutritional standards and methods of evaluation for food legume breeders*. International Development Research Centre, Ottawa, 1977. p.61-72.
25. CAMPOS, H. R. Observações sobre variedades. Ervilha. In: *Instituto Agronômico do Estado. Relatório Anual*. Campinas, 1960.
26. CAUSERET, J.; HUGOI, D.; ARNOUX, J. Étude statistique des variations de l'excretion d'azote métabolique fécal et d'azote endogene urinaire en fonction du poids corporel, du poids des ingesta et du poids des feces chez le jeune rat. I. En régime protéoprive. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, Jouy, 5(1):61-78, 1965.

27. CHACKO, A.; CUMMINGS, J. H. Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. *Gut*, London, 29(6):809-15, 1988.
28. CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S.; SALUNKE, D. K. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum*, L.) seeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, 25(2):107-58, 1986.
29. CHICK, H.; HUTCHINSON, J. C. D.; JACKSON, H. M. CCIII. The biological value of proteins. VI. Further investigation on the balance sheet method. *The Biochemical Journal*, Colchester, 29:1702-11, 1935.
30. DA COSTA, L. R.; CROFT, D. N.; CREAMER, B. Protein loss and cell loss from the small-intestinal mucosa. *Gut*, London, 12:179-83, 1971.
31. DE ARAÚJO, J. P. P. & WATT, E. E. Composição química das sementes de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*, (L.) WALP.) e correlação entre alguns de seus componentes. In: *I Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi*. Anais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Goiânia, 1982. p.293-6.

32. DE ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E.; GUAZZELLI, R. J. O programa cooperativo de pesquisas de caupi e o aumento da disponibilidade de cultivares melhoradas. In: **I Reunião de Pesquisa de Caupi**. Anais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Goiânia, 1987. p.48.
33. DEL ROSARIO, R. R.; LOZANO, Y.; NOEL, M. G. The chemical and biochemical composition of legume seeds. 2. Cowpea. **Philippine Agriculturist**, Laguna, **64**:49-67, 1981.
34. DUNCAN, D. B. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**, Washington, **11**(1-4):1-42, 1955.
35. DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Studies on the nutritive value of beans. In: **Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods**. Proceedings. Ribeirão Preto, 1973. p. 13-26.
36. ESH, G. C.; DE, T. S.; BASU, U. P. Influence of genetic strain and environment on the protein content of pulses. **Science**, Washington, **129**:129-30, 1959.
37. EVANS, R. J. & BAUER, D. H. Studies of the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, **26**(4):779-84, 1978.

38. EVANS, M. & BOULTER, D. Crude protein and sulfur amino acid contents of some commercial varieties of peas and beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 31(3):238-42, 1980.
39. FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; GEE, J. M.; JOHNSON, I. T. The influence of cooked kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) on intestinal cell turnover and faecal nitrogen excretion in the rat. *The British Journal of Nutrition*, Cambridge, Great Britain, 49:303-12, 1983.
40. FERN, E. B.; GARLICK, P. J.; McNURLAN, M. A; WATERLOW, J. C. The excretion of isotope in urea and ammonia for estimating protein turnover in man with [ <sup>15</sup>N ] glycine. *Clinical Science*, Colchester, 61(2):217-28, 1981.
41. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Necesidades de energía y de proteínas. Ginebra, 1973. (Serie de informes tecnicos, 522).
42. \_\_\_\_\_. Necesidades de energía y de proteínas. Ginebra, 1985. (Serie de informes tecnicos, 724).
43. \_\_\_\_\_. FAO Production yearbook. 1986. Rome, 1987. (Statistic series, 76).

44. FREIRE FILHO, F. R.; DE ARAÚJO, A. G.; CARDOSO, M. J.  
*Vigna unguiculata* (L.) WALP. Nomenclatura científica e  
nomes vulgares. In: I Reunião Nacional de Pesquisa de  
Caupi. Anais. Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e  
Feijão. Goiânia, 1982. p.43-7.
45. FREIRE FILHO, F. R.; SANTOS, A. A.; MESQUITA, R. C. M.;  
RIBEIRO, V.Q. Comportamento de 25 cultivares de feijão  
caupi (*Vigna sinensis*, L. SAVI.) no estado do Piauí.  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (Comunicado  
Técnico 6, de 19/9/78).
46. GERVANI, P. & THEOPHILUS, F. Effect of home processing on  
the nutrient composition of certain high yielding legume  
varieties. *The Indian Journal of Nutrition and Dietetics*,  
Coimbatore, 17:443-6, 1980.
47. GEIGER, E.; HUMAN, L. E.; MIDDLETON, M. J. Nitrogen  
content of gastrointestinal tracts of rats during  
absorptive period. *Proceedings of the Society for  
Experimental Biology and Medicine*, New York,  
97(1):232-34, 1958.

48. GUEGUEN, J. & BARBOT, J. Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum*, L.) protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 42:209-24, 1988.
49. HALLIDAY, D. Advances in the measurement of stable isotopes. In: WATERLOW, J. C. & STEPHEN, J. M. ed. *Nitrogen metabolism in man*. Applied Science Publishers, London, 1981. p.295-302.
50. HALLIDAY, D. & READ, W. W. C. Mass spectrometric assay of stable isotopic enrichment for the estimation of protein turnover in man. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, 40:321-34, 1981.
51. HEGSTED, D. M.; MILLS, R. C.; ELVEHJEM, C. A.; HART, E. B. Choline in the nutrition of chicks. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 138:459-66, 1941.
52. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Tracer manual on crops and soils*. Bulletin Series, Vienna, 172, 1972.
53. HONAVAR, P. M.; SHIH, C. V.; LIENER, I. E. Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 77(62):109-114, 1962.

54. JAFFÉ, W. G. Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods. Preface. Proceedings. Ribeirão Preto, 1973. p. 9.
55. JAFFÉ, W. G. Leguminosas para consumo humano. Ventajas y desventajas. Revista de la Facultad de Agronomía, Maracay, 35:87-95, 1986.
56. JAFFÉ, W. G. & BRUCHER, O. El contenido de nitrógeno total y aminoácidos azufrados en diferentes líneas de frijoles. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Guatemala, 24(1):107-13, 1974.
57. KAPLAN, L. Archeology and domestication in american Phaseolus (beans). Economic Botany, Baltimore, 19:358-68, 1965.
58. KEITH, M. O. & BELL, J. M. Digestibility of nitrogen and amino acids in selected protein sources fed to mice. The Journal of Nutrition, Philadelphia, 118(5):561-8, 1988.
59. KELLY, J. D. & BLISS, F. A. Quality factors affecting the nutritive value of bean seed protein. Crop Science, Madison, 15:757-60, 1975.

60. KHAN, M. A.; JACOBSEN, I.; EGGUN, B. O. Nutritive value of some improved varieties of legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 30:395-400, 1979.
61. KOCHHAR, N.; WALKER, A. F.; PIKE, D. J. Effect of variety on protein content, amino acid composition and trypsin inhibitor activity of cowpeas. *Food Chemistry*, Washington, 29:65-78, 1988.
62. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *Journal of General Physiology*, New York, 29:149-54, 1946.
63. LANFER MARQUEZ, U. M. & LAJOLO, F. M. Digestibility of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) albumins and globulin G 1: contribution of endogenous nitrogen and sulfur. In: LAJOLO, F. M. & LANFER MARQUEZ, U. M. ed. *Advances in Bean Research. Proceedings*. (1986 seminar). Universidade de São Paulo, 1988. p. 35-43.
64. LANTZ, E. M.; GOUGH, H. W.; CAMPBELL, A. M. Effect of variety, location and years on the protein and amino acid content of dried beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 6(1):58-60, 1958.

65. LEES, R. Manual de analisis de alimentos. [Laboratory handbook of methods of food analysis]. Zaragoza, Acribia, 1979. p. 17, 124-25.
66. LEMOS, J. W. V. & DE ALMEIDA, C. A. O feijão caupi, *Vigna unguiculata* (L). WALP, no estado de Alagoas. In: I Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi. Anais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Goiânia, 1982. p. 46-7.
67. LEVIN, J. Estatística aplicada a Ciências Humanas. [Elementary statistics in social research]. 2 ed. Harper & Row, São Paulo, 1978. p. 211.
68. LIENER, I. E. & THOMPSON, R. M. In vitro and in vivo studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). *Qualitas Plantarum. Plant Foods for Human Nutrition*, The Hague, 30:13-25, 1980.
69. LOFGREEN, G. P. & KLEIBER, M. The metabolic fecal nitrogen excretion of the young calf and the true digestibility of casein. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 49:183-90, 1953.

70. MANAN, F.; HUSSAIN, T.; ALLI, I.; IQBAL, P. Effect of cooking on phytic acid content and nutritive value of pakistani peas and lentils. *Food Chemistry*, Barking, 23: 81-7, 1987.
71. MARTIN C. J. & ROBINSON, R. The minimum nitrogen expenditure of man and the biological value of various proteins for human nutrition. *The Biochemical Journal*, Colchester, 16:407-47, 1922.
72. McLAREN, D. S. The great protein fiasco. *The Lancet*. London, 13:93-6, 1974.
73. MEINERS, C. R.; DERISE, N. L.; LAU, H. C.; RITCHEY, S. J.; MURPHY, E. W. Proximate composition and yeld of raw and cooked mature dry legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 24(6):1122-6, 1976.
74. MELNICK, D. & OSER, B. L. The influence of heat processing on the functional and nutritive properties of protein. *Food Technology*, Chicago, 3(2):57-70, 1949.
75. MITCHEL, H. H. A method of determinig the biological value of protein. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 58:873-903, 1923/24.

76. MITCHEL, H. H. The biological value of proteins at different levels of intake. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 58:905-22, 1924.
77. MITCHELL, H. H. & BERT, M. H. The determination of metabolic fecal nitrogen. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 52:483-97, 1954.
78. MITCHELL, H. H. & BLOCK, R. J. Some relationship between the amino acid contents of proteins and their nutritive value for the rat. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 163:599-620, 1946.
79. MITCHELL, H. H. & CARMAN, G. G. The biological value of the nitrogen of mixtures of patent white flour and animal foods. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 68:183-215, 1926.
80. MIYASAKA, S. O grão-de-bico. *O Agrônômico*. Campinas, 13(5-6):11-3, 1961.
81. MONTES, A. L. *Bromatologia*. Buenos Aires, Universitária, 1966. p. 10.

82. MOSHA, A. C. The use of common bean as human food in Tanzania. In: Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods. Proceedings. Ribeirão Preto, 1973. p. 273-80.
83. NAGAI, H. Ervilha (*Pisum sativum*, L.). Boletim do Instituto Agrônômico. Campinas, 200:89-90, 1986.
84. NASSET, S. & JU, J. S. Mixture of endogenous and exogenous protein in the alimentary tract. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 74:461-5, 1961.
85. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Laboratory animal management. Separata do *ILAR News*, Washington, 20(3): L1 -L5, 1977.
86. \_\_\_\_\_. National Research Council. Recommended dietary allowances. 9 ed., Washington, 1980.
87. \_\_\_\_\_. National Research Council. Recommended dietary allowances. 10 ed., Washington, 1989.
88. NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION. ICN Diet Catalog. ICN Life Sciences Group. Cleveland, 1977/78.

89. OGUN, P. O.; MARKAKIS, P.; CHENOWETH, W. Effect of processing on certain antinutrients in cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science*, Chicago, 54(4):1084-5, 1989.
90. OLESEN, K.; HEILSKOV, N. C. S.; SCHONHEYDER, F. The excretion of 15 N in urine after administration of 15 N-glycine. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 15:95-107, 1954.
91. OLIVEIRA, A. C. & SGARBIERI, V. C. Perda de nitrogênio endógeno de ratos em dietas de feijão. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 36(7):887, 1984. Suplemento.
92. OLIVEIRA, A. C. Fatores endógenos e exógenos com influência na digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.
93. OLIVEIRA, A. C. & SGARBIERI, V. C. Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 116:2387-92, 1986a.

94. OLIVEIRA, A. C. & SGARBIERI, V. C. The influence of rat endogenous nitrogen excretion on the assessment of bean protein quality. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Tokyo, 32:425-36, 1986b.
95. OLIVEIRA, A. C.; SGARBIERI, V. C.; VICTÓRIA, R. L.; CERRI, C. C. Avaliação biológica do proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) utilizando carbono 14 e nitrogênio 15. In: LAJOLO, F. M. & LANFER MARQUEZ, U. M. ed. *Advances in bean research. Proceedings.* (1986 seminar). Universidade de São Paulo, 1988. p. 35-43.
96. OMUETI, O. & SINGH, B. B. Nutritional attributes of improved varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.). *Human Nutrition: Food Sciences and Nutrition*, Londres, 4F(2):103-12, 1987.
97. OSER, B. L. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. *Journal of the American Dietetic Association*, Chicago, 51(27):396-402, 1951.
98. PAULL, A. A. & SOUTHGATE, D. A. T. McCance and Widdowson's. *The composition of foods.* 4 ed. Londres, Elsevier/Holand Biomedical Press, 1978.

99. PEARSON, D. Técnicas de laboratório para el análisis de alimentos. [Laboratory techniques in food analysis]. Zaragoza, Acribia, 1976. p. 10-2.
100. PELLETT, P. L. Protein quality evaluation revisited. Food Technology, The Hague, 32(5):60-79, 1978.
101. PIKE, R. L. & BROWN, M. L. Nutrition: an integrated approach. New york, John Wiley & Sons, Inc., 1967. p. 410.
102. PION, R.; MENOLES-PEREIRA, E.; PRUGNAUD, J. Effect of composition and processing on the nutritive value of some leguminous seeds. Journal of American Oil Chemists Society, Champaign, 56:150-3, 1979.
103. POMPEU, A. S. Catú, Aeté-3, Aroana 80, Moruna 80, Carioca 80 e Aysó: novos cultivares de feijoeiro. Bragantia, Campinas, 41:213-8, 1982.
104. REGO NETO, J.; SIMPLÍCIO, A.A.; DAS CHAGAS, M. C. M. Cultura do feijão vigna no Rio Grande do Norte. I Reunião Nacional sobre Pesquisa em Caupi. Anais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Goiânia, 45-6, 1982.

105. REICHERT, R. D. & MACKENZIE, S. L. Composition of peas (*Pisum sativum*) varying widely in protein content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 30:312-7, 1982.
106. ROMEO , M.; ESCOBAR, B.; MASSON, L.; MELLA, M. A. Composición química de harina de leguminosas cruda y precocida. *Alimentos*, Santiago, 8(1):3-10, 1983.
107. ROY, A. D.; CAMPBELL, R.; GOLDBERG, D. M. Effect of diet on the trypsin and chymotrypsin output in the stools of patients with an ileostomy. *Gastroenterology*, Baltimore, 53(4):584-589, 1967.
108. SARWAR, G. & PEACE, R. W. Comparison between true digestibility of total nitrogen and limiting aminoacids in vegetable protein fed to rats. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 116(7):1172-84, 1986.
109. SCHNEIDER, B. H. XLVIII. The relationship of the metabolic nitrogen of the feces to body weight and to food intake for rats. *The Biochemical Journal*, Colchester, 28:360-4, 1934.
110. SCHOENHEIMER, R. & RITTEMBERG, D. The application of isotopes to the study of intermediary metabolism. *Science*, Washington, 87(2254):221-26, 1938.

111. SELIGSON, F. H. & MACKEY, L. N. Variable predictions of protein quality by chemical score due to aminoacid analysis and reference pattern. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 114:682-91, 1984.
112. SGARBIERI, V. C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família Leguminosae. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 32(1):78-84, 1980.
113. SGARBIERI, V. C.; ANTUNES, P. L.; ALMEIDA, L. D. Nutritional evaluation of four varieties of dry bean. *Journal of Food Science*, Chicago, 44:1306-8, 1979.
114. SGARBIERI, V. C.; CLARKE, E. M. W.; PUSZTAI, A. Proteolytic breakdown of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) storage proteins: nutritional implications. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, Oxford, 33:881-91, 1982.
115. SGARBIERI, V. C. & WHITAKER, J. R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Advances in Food Research*, Orlando, 28:93-166, 1982.

116. SHARP, G. S.; LASSEN, S.; SHANKMAN, S.; HAZLET, J. W.; KENDIS, M. Studies of protein retention and turnover using nitrogen 15 as a tag. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 63:155-62, 1957.
117. SINGH, D. K. ; RAO, A. S.; SINGH, R.; JAMBUNATHAN, R. Aminoacid composition of storage proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum*, L.) cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 43:373-9, 1988.
118. SINGH, K. B.; ERSKINE, W.; ROBERTSON, L. D.; NAKKOUL, H.; WILLIAMS, P. C. Influence of pretreatment on cooking quality parameters of dry food legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 44:135-42, 1988.
119. SINGH, U. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum*, L.): current status and future research needs. *Qualitas Plantarum. Plant Foods for Human Nutrition*, The Hague, 35:339-51, 1985.
120. SINGH, U.; KUMAR, J.; GOWDA, C. L. L. The protein content of chickpea (*Cicer arietinum*, L.) grown at different locations. *Qualitas Plantarum. Plant Foods for Human Nutrition*, The Hague, 32:179-84, 1983.

121. SMUTS, D. B. The relation between the basal metabolism and the endogenous nitrogen metabolism, with particular reference to the estimation of the maintenance requirement of protein. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 9(4):403-33, 1935.
122. SNEDECOR, G. W. *Métodos de estadística; su aplicación a experimentos en agricultura y biología*. Trad. Antônio E. Marino, 4 ed. Buenos Aires, Acme Agency, 1948. p. 179.
123. SOTELO, A.; ARENAS, M. L.; HERNANDEZ, M. Utilización del garbanzo (*Cicer arietinum*, L.) en formulas no lacteas. I. Composición química y calidad nutritiva del garbanzo y su comparación con formulas infantiles comerciales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Guatemala, 37(3):551-9, 1987a.
124. SOTELO, A.; HERNANDEZ, M.; LARRACILLA, J.; ARENAS, M. L.; PALAPA, E. Utilización del garbanzo (*Cicer arietinum*, L.) en formulas no lacteas. II. Balance de nitrogeno en niños con intolerancia a la lactosa, alimentados con una formula a base de garbanzo y un producto comercial de soya. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Guatemala, 37(3):468-79, 1987b.

125. SPRINSON, D. B. & RITTEMBERG, D. The rate of interaction of the amino acids of the diet with the tissue proteins. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 180:715-26, 1949.
126. STEFEE, W. P.; GOLDSMITH, R. S.; PENCHARZ, P. B.; SCRIMSHAW, N. S.; YOUNG, V. R. Dietary protein intake and dynamic aspects of whole body nitrogen metabolism in adult humans. *Metabolism*, Orlando, 25(3):281-97, 1976.
127. STEIN, T. P.; LESKIW, M. L.; WALLACE, H. W. Equilibration of 15 N-labeled amino compounds in man. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 230(5):1326-30, 1976.
128. TOBIN, G. & CARPENTER, K. J. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): a literature review. *Nutrition Abstracts and Reviews - Series A. Human and Experimental*, Farnham Royal, 48(11):919-36, 1978.
129. ULLOA, J. A.; VALENCIA, M. E.; GARCIA, Z. H. Protein concentrate from chickpea: nutritive value of a protein concentrate from chickpea (*Cicer arietinum*) obtained by ultrafiltration and its potential use in a infant formula. *Journal of Food Science*, Chicago, 53(5):1396-8, 1988.

130. VALENCIA, M. E.; TRONCOSE, R.; HIGUERA, I. Linear programming formulation and biological evaluation of chickpea-based infant foods. *Cereal Chemistry*, St. Paul, 65(2):101-4, 1988.
131. WATERLOW, J. C.  $^{15}\text{N}$  end-product methods for the study of whole body protein turnover. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, 40:317-20, 1981.
132. WATERLOW, J. C. Protein turnover with special reference to man. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, Cambridge, 69:409-38, 1984.
133. WATERLOW, J. C.; GOLDEN, M. H. N.; GARLICK, P. J. Protein turnover in man measured with  $^{15}\text{N}$  comparison of end products and dose regimes. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 235(2):E165-74, 1978.
134. WILLIAMS, P. C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 24:343-348, 1973.

135. WOLZAK, A.; BRESSANI, R.; BRENES, R. G. A comparison of in vivo and in vitro estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. *Qualitas Plantarum. Plant Foods for Human Nutrition*. The Hague, 31:31-43, 1981.
136. WU, H. & BISHOP, C. W. Pattern of N 15 excretion in man following administration of N 15 labeled glycine. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 14:1-5, 1959.
137. WU, H. & SENDROY JR., J. Pattern of N 15 excretion in man following administration of N 15 labeled phenylalanine. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 14:6-10, 1959.
138. WU, H.; SENDROY JR., J.; BISHOP, C. W. Interpretation of urinary N 15 excretion data following administration of an N 15 labeled amino acid. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 14(1):11-21, 1959.
139. WUTZKE, K.; HEINE, W.; DRESCHER, V.; RICHTER, I.; PLATH, C. 15 N -labelled yeast protein, a valid tracer for calculating whole-body protein parameters in infants: a comparison between [15N]-yeast protein and [15N]-glycine. *Human Nutrition. Clinical Nutrition*. Westport, 37C(5):317-27, 1983.

140. WUTZKE, K. D.; HEINE, W.; FRIEDRICH, M.; WALTHER, F.; MULLER, M. MARTENS, E. Excretion of  $^{15}\text{N}$  and incorporation into plasma proteins after high-dosage pulse labelling with various tracer substances in infants. *Human Nutrition. Clinical Nutrition*, Westport, 41C(6):431-9, 1987.
141. YAMAGUCHI, M.; HWANG, H. G.; KAWAGUCHI, K.; KANDATSU, M. Metabolism of  $^{15}\text{N}$ -labelled chlorella protein in growing rats with special regard to the nutritive value. *The British Journal of Nutrition*, Cambridge, Great Britain, 30(3):391-9, 1973.
142. YOUNG, V. Dynamics of human whole body amino acid metabolism: use of stable isotope probes and relevance to nutritional requirements. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, Tokyo, 27:395-413, 1981.
143. YOUNG, V. R. 1987 Mc Collum Award Lecture. Kinetics of human amino acid metabolism: nutritional implications and some lessons. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, 46:709-25, 1987.

# ADENDO 1

Recomendações de aminoácidos\* e composição para proteína padrão\*\*, segundo National Academy of Sciences (National Research Council, U.S.).

| AA      | CRIANÇA                |         |        | CRIANÇAS               |    |        | 1980   |        |
|---------|------------------------|---------|--------|------------------------|----|--------|--------|--------|
|         | LACTENT.               | 10-12 A | ADULT. | LACTENT.               | 2A | 10-12A | ADULT. | PADRÃO |
|         | * mg/kg peso/dia, 1980 |         |        | ** mg/g proteína, 1989 |    |        | mg/g P |        |
| HIS     | 33                     | ?       | ?      | 16                     | 19 | 19     | 11     | 17     |
| ILE     | 83                     | 28      | 12     | 40                     | 28 | 28     | 13     | 42     |
| LEU     | 135                    | 42      | 16     | 93                     | 66 | 44     | 19     | 70     |
| LYS     | 99                     | 44      | 12     | 60                     | 58 | 44     | 16     | 51     |
| MET+CYS | 49                     | 22      | 10     | 33                     | 25 | 22     | 17     | 26     |
| PHE+TYR | 141                    | 22      | 16     | 72                     | 63 | 22     | 19     | 73     |
| THR     | 68                     | 28      | 8      | 50                     | 34 | 28     | 9      | 35     |
| TRP     | 21                     | 4       | 3      | 10                     | 11 | 9      | 5      | 11     |
| VAL     | 92                     | 25      | 14     | 54                     | 35 | 25     | 13     | 48     |

# ADENDO 2

Recomendações de aminoácidos e composição para proteína padrão, segundo Food and Agriculture Organization, em mg/gde proteína.

| AMINOÁCIDO | LACTENTES |      | PRÉ ESCOL. | ESCOLARES |       | ADULTOS |      | PADRÃO |
|------------|-----------|------|------------|-----------|-------|---------|------|--------|
|            |           |      | (2 A 5 A.) | (10 A     | 12 A) |         |      |        |
|            | 1973      | 1985 | 1985       | 1973      | 1985  | 1973    | 1985 | 1973   |
| HISTIDINA  | 14        | 26   | 19         | --        | 19    | --      | 16   | --     |
| ISOLEUCINA | 35        | 46   | 28         | 37        | 28    | 18      | 13   | 40     |
| LEUCINA    | 80        | 93   | 66         | 56        | 44    | 25      | 19   | 70     |
| LISINA     | 52        | 66   | 58         | 75        | 44    | 22      | 16   | 55     |
| MET + CYS  | 29        | 42   | 25         | 34        | 22    | 24      | 17   | 35     |
| PHE + TYR  | 63        | 72   | 63         | 34        | 22    | 25      | 19   | 60     |
| TREONINA   | 44        | 43   | 34         | 44        | 28    | 13      | 9    | 40     |
| TRIPTOFANO | 8,5       | 17   | 11         | 4,6       | 9     | 6,5     | 5    | 10     |
| VALINA     | 47        | 55   | 35         | 41        | 25    | 18      | 13   | 50     |