

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição (DEPAN)

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Ricardo Gonçalves
Coelho e aprovada pela Comissão Julgadora
em 20.12.93

[Assinatura]

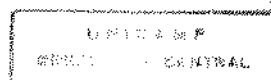
QUALIDADE PROTÉICA E BIODISPONIBILIDADE
DE METIONINA EM PROTEÍNAS DO FEIJÃO
"IAC-CARIOCA 80 SH" (*Phaseolus vulgaris*, L.)

RICARDO GONÇALVES COELHO *mt.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri, PhD. *Carlos*

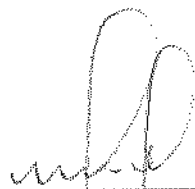
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência da Nutrição

CAMPINAS, 1993



93.000.000

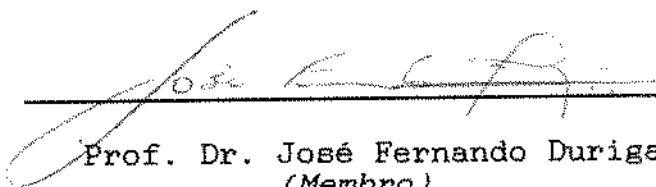
BANCA EXAMINADORA



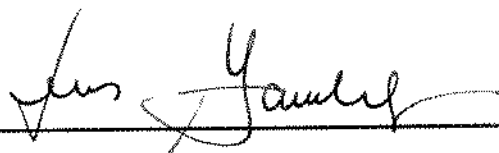
Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador)



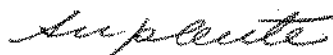
Prof. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez
(Membro)



Prof. Dr. José Fernando Durigan
(Membro)

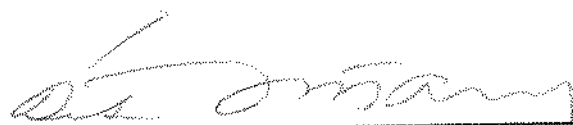


Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro
(Membro)



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
(Membro)

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Débora De Queiroz Tavares
(Membro)



Prof. Dra. Maria Antônia Martins Galeazzi
(Membro)

*Dedico este trabalho à minha esposa
Beatriz, aos meus filhos Leonardo e
Carolina, à minha mãe, Ethel, e tam
bém às minhas famílias campineiras,
Koester Gobbo e Machado de Moraes,
que solidariamente dividiram comigo,
por vezes com sacrifícios, todas as
alegrias vividas ao longo de todos
esses anos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sgarbieri, por sua amizade, por seu apoio constante e determinado e por sua orientação crítica e construtiva.

Ao Prof. Dr. John R. Whitaker e ao Dr. Chao Wu, da Universidade da California, pelas importantes sugestões e pela gentileza de fornecer alguns reagentes básicos, viabilizando a utilização da metodologia de determinação de metionina pelo método da Cloramina-T.

Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira e sua equipe do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, e em particular ao servidor Edmyr, que viabilizaram a realização das análises de composição aminoacídica por HPLC.

A Liana Dawood, companheira de todo o dia no laboratório, pela paciência, amizade e dedicação, e pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

A amiga Maria Antônia Galeazzi, que desde o início acompanhou a realização do projeto com muito interesse, e cuja experiência foi sempre solicitada para elucidar problemas eventualmente surgidos.

Aos queridos amigos e companheiros de todo dia, Ivan, Hilda, Mabel, Cecília, Vera, Semíramis e Margareth, pelo apoio constante e valioso e, portanto, muito especial.

A Prof. Isa de Pádua Cintra, chefe do Depto. de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como também aos professores do referido departamento, que durante cinco anos possibilitaram minha ausência da Universidade, solucionando todas as dificuldades surgidas em função do afastamento, de forma eficiente e competente.

Aos eternos amigos Mendanha e Liane, Marcelo Pertence e Piu, o primo Alex, Menelick e Flavia, Levy, Lulu, Dirceu, Maria José, Marilac, Amélia, Isa, Djalma, Angela, Marcelo Seabra e Mariângela, Paulinho e Nina, que em São Paulo, Ouro Preto ou Belo Horizonte, de alguma forma sempre estiveram presentes comigo nos momentos mais difíceis.

Aos professores e amigos Lieselote Jokl, David Lee Nelson, Marialice Silvestre e Maria Beatriz Abreu Gloria, da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo apoio.

Aos servidores da UNICAMP e aos companheiros da Imprensa Universitária e do CPD da UFOP, que contribuíram, de forma tão carinhosa, para a concretização deste trabalho, em todos os seus aspectos.

A CAPES e à FUCCAMP, pelas bolsas de estudo, e à FAPESP, pelo financiamento de equipamentos e reagentes indispensáveis para a execução do projeto.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
I- INTRODUÇÃO	4
II- REVISAO BIBLIOGRAFICA	8
2.1. Descrição das proteínas de feijão	9
2.2. Valor nutritivo das proteínas de feijão	14
2.2.1. Teor protéico	15
2.2.2. Composição aminoacídica	16
2.2.3. Digestibilidade	17
2.2.4. Biodisponibilidade dos aminoácidos sulfura dos	24
2.2.5. Utilização das proteínas de feijão	32
2.3. Composição aminoacídica como base para avaliação da qualidade protéica das frações	33
2.4. Considerações sobre a determinação de metionina ...	35
III- MATERIAL E METODOS	42
3.1. Cultivar	42

	11
3.2. Preparo das farinhas	42
3.2.1. Feijão Integral Autoclavado (FIA).....	42
3.2.2. Feijão Cru Descorticado (FCD).....	42
3.3. Ensaio biológico	43
3.3.1. Balanço de nitrogênio (BN), valor biológico (VB), quociente de utilização líquida da proteína (NPU) e digestibilidade, aparente (D_{ap}) e verdadeira (D_v)	43
3.3.2. Estimativa do teor de metionina biodisponível na farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado: variação do ganho de peso e do quociente de eficiência protéica operacional (PER_{op}) em função da adição, à dieta, de quantidades crescentes de metionina	46
3.4. Obtenção das frações cruas e tratadas termicamente.	48
3.4.1. Fracionamento	48
3.4.2. Tratamento térmico das frações protéicas ...	51
3.5. Análises químicas e bioquímicas	51
3.5.1. Composição química centesimal	51
3.5.2. Composição aminoacídica	52
3.5.2.1. Farinhas de feijão cru e descorticado e integral autoclavado	52
3.5.2.2. Frações protéicas cruas e autoclavadas .	54
3.5.2.3. Determinação de triptofano	55
3.5.2.4. Determinação de metionina total : hidrólise alcalina e quantificação pelo método da Cloramina-T	56
3.5.2.5. Determinação <i>in vitro</i> de metionina bio disponível: hidrólise enzimática e quantificação pelo método da Cloramina-T ...	59
3.5.2.6. Determinação de cisteína	60
3.5.3. Atividade do inibidor de tripsina (TIA)	61

3.5.4. Carboidratos Totais (CT)	62
3.5.5. Atividade Hemaglutinante (AHT)	63
3.5.6. Digestibilidade <i>in vitro</i>	63
3.6. Proteólise e liberação de metionina <i>in vitro</i>	65
3.6.1. Proteólise	65
3.6.2. Acompanhamento do grau de hidrólise (GH) ...	66
3.6.3. Acompanhamento da liberação de metionina <i>in vitro</i>	68
3.7. Índices relativos à avaliação <i>in vitro</i> da qualidade das proteínas das farinhas e frações protéicas .	68
3.7.1. " Valor Biológico Calculado " (VB-C)	68
3.7.2. " Coeficiente de Utilização Protéica Líquida Calculado " (NPU-C)	70
3.8. Tratamento estatístico	70
IV - RESULTADOS	71
4.1. Composição centesimal da farinha de feijão integral autoclavado (FIA)	71
4.2. Ensaio Biológicos	72
4.2.1. Balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (D_{ap}), digestibilidade verdadeira (D_v), valor biológico (VB) e utilização protéica líquida (NPU) da farinha integral autoclavada	72
4.2.2. Estimativa do teor de metionina biodisponível na FIA: variação do ganho de peso e do quociente de eficiência protéica operacional (PER_{op}) em função da adição de quantidades crescentes de metionina à dieta basal	74

4.3. Composição aminoacídica da farinha crua descortificada e da farinha integral de feijão autoclavado.	76
4.4. Metionina total e biodisponível <i>in vitro</i> nas farinhas crua descortificada e integral de feijão autoclavado	77
4.4.1. Estudos de recuperação	77
4.4.2. Teores de metionina total e biodisponível <i>in vitro</i> na FCD e na FIA	80
4.5. Digestibilidade <i>in vitro</i> nas farinhas crua descortificada e integral de feijão autoclavado	81
4.6. Fracionamento da farinha descortificada	82
4.6.1. Balanço de massa e contribuição percentual das frações protéicas isoladas	82
4.6.2. Concentração de carboidrato total, atividade antitriptica e hemaglutinante das frações protéicas isoladas	85
4.7. Composição aminoacídica das frações protéicas cruas e autoclavadas	88
4.8. Digestibilidade <i>in vitro</i> das frações protéicas cruas e autoclavadas	91
4.9. Metionina potencialmente biodisponível nas frações cruas e autoclavadas	92
4.10. Grau de hidrólise e liberação de metionina das frações cruas e autoclavadas	95
4.11. Índices relativos à avaliação <i>in vitro</i> da qualidade de protéica das frações	108
4.11.1. " Valor biológico calculado " (VB-C).....	108
4.11.2. " Coeficiente de utilização protéica líquida calculado " (NPU-C)	109

V - DISCUSSAO	111
5.1. Avaliação da qualidade protéica da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado	111
5.1.1. Composição centesimal	
5.1.2. Ensaio biológico	111
5.1.2.1. Balanço de nitrogênio	111
5.1.2.2. Digestibilidade aparente (D_{ap}) e verdadeira (D_v), valor biológico verdadeiro (VB) e quociente de utilização protéica líquida (NPU)	112
5.1.2.3. Estimativa do teor de metionina biodisponível	115
5.1.3. Composição aminoacídica (exceto metionina potencialmente biodisponível)	117
5.1.4. Metionina total e potencialmente biodisponível <i>in vitro</i>	119
5.1.4.1. Considerações sobre a metodologia	119
5.1.4.2. Considerações sobre os teores de metionina total e biodisponível determinados <i>in vitro</i> nas farinhas	127
5.1.5. Digestibilidade <i>in vitro</i> da farinha integral de feijão autoclavado	133
5.2. Caracterização química, bioquímica e nutricional das frações isoladas	135
5.2.1. Fracionamento: balanço de massa e contribuição protéica das frações isoladas	135
5.2.2. Teor de carboidratos, atividade antitriptíca e hemaglutinante em cada fração	136
5.2.3. Composição aminoacídica	137
5.2.4. Digestibilidade <i>in vitro</i>	142
5.2.5. Metionina potencialmente biodisponível <i>in vitro</i>	144

5.2.6. Grau de hidrólise e liberação de metionina das frações protéicas cruas e autoclavadas .	147
5.2.7. Índices de qualidade protéica das frações determinados <i>in vitro</i>	150
5.3. Considerações finais	157
VI - CONCLUSOES	159
VII - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	162

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Esquema do fracionamento	49
FIGURA 2-	Evolução do ganho de peso dos animais e do quociente de eficiência protéica operacional, em função da suplementação da dieta basal com quantidades crescentes de metionina, em base protéica	75
FIGURA 3-	Percentuais das proteínas totais extraídas do feijão "IAC-Carioca 80 SH", fornecidos por cada uma das frações protéicas isoladas	84
FIGURA 4-	Percentuais de atividade antitriptica e hema glutinante das frações protéicas isoladas, expressos em relação ao total resultante da soma dos valores de todas as frações	87
FIGURA 5-	Variação do percentual de liberação de metionina pela proteólise <i>in vitro</i> pelo sistema pepsina/pancreatina em função do tratamento térmico.	94
FIGURA 6-	Contribuição percentual de metionina das frações isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH", expressa em relação à soma dos teores de metionina biodisponível de cada fração autoclavada ...	96
FIGURA 7-	Grau de hidrólise e percentual de liberação de metionina, expressos em relação ao conteúdo de metionina total da fração de globulinas, crua e autoclavada, pela ação da pepsina e da pancreatina	103
FIGURA 8-	Grau de hidrólise e percentual de liberação de metionina, expressos em relação ao conteúdo de metionina total da fração de globulina G1, crua e autoclavada, pela ação da pepsina e da pancreatina	104
FIGURA 9-	Grau de hidrólise e percentual de liberação de metionina, expressos em relação ao conteúdo de metionina total da fração de albuminas, crua e autoclavada, pela ação da pepsina e da pancreatina	105

FIGURA 10- Grau de hidrólise e percentual de liberação de metionina, expressos em relação ao conteúdo de metionina total da fração de lectinas/inibidores de enzimas digestivas, crua e autoclavada, pela ação da pepsina e da pancreatina 106

FIGURA 11- Grau de hidrólise e percentual de liberação de metionina, expressos em relação ao conteúdo de metionina total da fração de glutelinas, crua e autoclavada, pela ação da pepsina e da pancreatina 107

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Composição das dietas com 10% de proteínas e aprotéica, utilizadas no ensaio biológico para a determinação do VB, NPU, Dv e Dap na farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado	43
QUADRO 2 - Composição das dietas utilizadas no ensaio do Quociente de Eficiência Protéica operacional da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado	47
QUADRO 3 - Composição centesimal da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado	71
QUADRO 4 - Nitrogênio ingerido, fecal e urinário e balanço nitrogenado, de ratos que receberam dieta experimental e dieta aprotéica	72
QUADRO 5 - Digestibilidade aparente, digestibilidade verdadeira, valor biológico e utilização protéica líquida da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado	73
QUADRO 6 - Metionina adicionada, proteína ingerida, ganho de peso e quociente de eficiência protéica operacional.	74
QUADRO 7 - Composição aminoacídica da farinha crua descorticada e da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado	76
QUADRO 8 - Percentuais de recuperação de metionina não oxidada, determinados pelo método da Cloramina T, a partir de soluções de concentração conhecida	78
QUADRO 9 - Percentuais de recuperação de metionina, determinados pelo método da Cloramina T, a partir de soluções de concentração conhecida e na ovalbumina, submetidas à hidrólise alcalina	79
QUADRO 10- Metionina total, metionina biodisponível e percentual de metionina biodisponível <i>in vitro</i> nas farinhas crua descorticada e integral de feijão autoclavado	80

QUADRO 11- Digestibilidade protéica <i>in vitro</i> da farinha crua descorticada e integral do feijão "IAC- Carioca 80 SH" autoclavado e da caseína	81
QUADRO 12- Quantidade de proteína extraída, teor protéico e contribuição de cada uma das frações isoladas no fracionamento da farinha crua descorticada do feijão "IAC- Carioca 80 SH"	83
QUADRO 13- Carboidratos totais, atividade de inibidor de tripsina e hemaglutinante total, das frações de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores, isoladas do feijão "IAC- Carioca 80 SH"	86
QUADRO 14 - Composição aminoacídica das frações cruas de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores, isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH" .	89
QUADRO 15 - Composição aminoacídica das frações de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores, isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH", autoclavadas	90
QUADRO 16 - Digestibilidade <i>in vitro</i> das frações de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores de proteases, cruas e autoclavadas, isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH"	92
QUADRO 17 - Metionina potencialmente biodisponível nas frações de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores de proteases, cruas e autoclavadas, isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH"	93
QUADRO 18 - Leucina liberada <i>in vitro</i> (mEquiv/g de proteína) ao longo da hidrólise enzimática das frações cruas de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores do feijão "IAC- Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina	97
QUADRO 19 - Leucina liberada <i>in vitro</i> (mEquiv/g de proteína) ao longo da hidrólise enzimática das frações autoclavadas de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores do feijão "IAC- Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina	98

QUADRO 20 - Metionina liberada (g/16g N) durante a digestão *in vitro* das frações cruas de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores do feijão "IAC- Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina . 100

QUADRO 21 - Metionina liberada (g/16gN) durante a digestão *in vitro* das frações autoclavadas de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores do feijão "IAC-Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina 100

QUADRO 22 - Índices de correlação (r) entre a liberação de metionina e o grau de hidrólise, por unidade de tempo, das frações glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores do feijão "IAC-Carioca 80 SH", cruas e autoclavadas 101

QUADRO 23 - "Valor biológico calculado" das frações de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores de proteases do feijão "IAC-Carioca 80 SH", cruas e autoclavadas 108

QUADRO 24 - "Coeficiente de utilização protéica líquida calculado" das frações de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores de proteases do feijão "IAC-Carioca 80 SH", cruas e autoclavadas 110

RESUMO

Um novo cultivar de feijão, "IAC-Carioca 80 SH" (*Phaseolus vulgaris*, L.), foi desenvolvido a partir da variedade "Carioca 80", de elevada capacidade produtiva e qualidade protéica superior. Inicialmente, buscou-se caracterizar o valor nutritivo das proteínas da farinha integral do feijão autoclavado, determinando-se seu teor protéico, sua composição aminoacídica e também a digestibilidade, o teor de metionina biodisponível, o valor biológico (VB) e o quociente de utilização protéica líquida de suas proteínas (NPU), por métodos biológicos. Em seguida, as proteínas do feijão foram separadas em cinco frações, em função da solubilidade: glutelinas, globulina G1, globulinas, albuminas e lectinas/inibidores de proteases. A qualidade protéica das frações isoladas foi então avaliada por métodos *in vitro*, com base na determinação de parâmetros como digestibilidade, VB e NPU e com enfoque especial sobre a biodisponibilidade de metionina, incluindo a avaliação da extensão da liberação de metionina das proteínas ao longo da hidrólise enzimática, pelo sistema pepsina/pancreatina, antes e após tratamento térmico. Os resultados obtidos indicaram que o novo cultivar apresentou excelente qualidade protéica, apresentando digestibilidade superior à de outros cultivares brasileiros e um teor elevado de metionina, cisteína e tirosina. As proteínas da farinha integral do feijão autoclavado possuem VB e NPU superiores aos observados para outras variedades brasileiras de feijão. As glutelinas, que representam 23% do total das proteínas, mostraram-se as mais ricas em lisina e metionina e, quando

autoclavadas, apresentaram digestibilidade elevada e os maiores valores de NPU e VB, dentre todas as frações isoladas. As glutelinas forneceram proporcionalmente mais metionina biodisponível que as outras proteínas. Os resultados obtidos sugerem que o desenvolvimento de variedades contendo maiores teores de glutelinas e menores de globulina G1 poderá resultar em feijões com qualidade protéica superior.

ABSTRACT

A new bean cultivar, "IAC-Carioca 80 SH" (*Phaseolus vulgaris*, L.), was developed from "Carioca 80" variety, which has a high yield and superior protein quality. The nutritive value of the proteins in the whole autoclaved bean flour was evaluated by determining its protein level and amino acid composition, as well its digestibility, bioavailable methionine content, biological value (BV) and net protein utilization (NPU), by biological methods. The bean proteins were then separated in five fractions according to solubility: glutelins, globulin G1, globulins, albumins and lectin/protease inhibitors. The protein quality of these isolated fractions was evaluated by "in vitro" methods, determining its digestibility, BV and NPU, with special emphasis on methionine bioavailability, including the measurement of the extent of enzymatic methionine liberation from bean proteins by the pepsin/pancreatin system. The results indicated that the new cultivar presented an excellent protein quality. It showed digestibility superior to other Brazilian cultivars and also presented higher levels of bioavailable methionine, cysteine and tyrosine. The proteins of the autoclaved whole bean flour possesses BV and NPU superior to that observed for other Brazilian bean varieties. The GLU fraction, which constituted 23% of the total protein, was richer in lysine and methionine and also showed high digestibility after autoclavation. Its BV and NPU were the highest of all the other autoclaved bean fractions. The glutelins furnished proportionally more bioavailable methionine than the other proteins, when treated thermally. The results suggest that the development of varieties containing larger quantities of glutelins and smaller globulin G1 contents may yield beans of superior protein quality.

I - INTRODUÇÃO

Os feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) são as leguminosas mais consumidas no Brasil. A concentração de proteínas da maioria das variedades no país varia de 18 a 29% (7,55,178,179,187). Como possui quantidades elevadas de proteínas em relação a outros grãos, o feijão assume expressiva importância nutricional, principalmente para as populações de menor poder aquisitivo, concentradas na periferia das grandes cidades e no meio rural, exatamente as que apresentam maiores deficiências protéicas e calóricas e onde, fortuitamente, essa leguminosa tem grande aceitação.

No entanto, a qualidade e o valor nutritivo das proteínas do feijão são limitadas por uma série de fatores:

i) a composição aminoacídica é limitada em aminoácidos sulfurados e triptofano, apesar de conterem quantidades relativamente elevadas de lisina, que lhes permite complementar as proteínas dos cereais na alimentação diária do brasileiro (101,165,182,187);

ii) evidências indicam que a biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados não supera 58% da metionina total contida nos grãos (7,18,55,56,57, 63,64,131,163,178,187);

iii) essas proteínas têm digestibilidade reduzida, mesmo quando comparadas com outras proteínas de origem vegetal, sendo que alguns de seus componentes possuem ação antinutricional, como compostos fenólicos, lectinas e inibidores de enzimas digestivas (118,165,182,187).

Pesquisadores brasileiros vem realizando estudos sobre a biodisponibilidade da metionina em variedades de feijões cultivadas

no país, encontrando percentuais que variam de 29 a 46,8% de metionina biodisponível (7,55,56,178,186).

Recentemente, um novo cultivar brasileiro denominado "Carioca 80", apresentou um valor biológico superior a 80%, utilização protéica líquida de 52,2% e biodisponibilidade de metionina de 56,8%, valores maiores que os encontrados até então em outros cultivares brasileiros (198). As quantidades de metionina disponível determinadas na variedade foram aparentemente elevadas, quando comparadas com a concentração média de metionina observada para 100 linhagens puras de feijões (38).

O "Carioca 80" é proveniente do cruzamento de tres linhagens de elevada capacidade produtiva, possuindo um halo alaranjado que permite diferenciá-lo do "Carioca". No entanto, apesar de não ser levada em conta pelo consumidor, a presença deste halo na variedade "Carioca 80" provocava deságio do produto pelos compradores/cerealistas. Desenvolveu-se então um novo cultivar, denominado "IAC-Carioca 80 SH", pela retirada da linhagem que induzia o aparecimento do halo nos grãos (41).

As consequências da retirada de uma das linhagens sobre o valor protéico do novo cultivar ainda não foram avaliadas. O cultivar constitui-se, no momento, na principal variedade disponível ao consumidor nos estados de São Paulo e Minas Gerais, com boa aceitação por parte da população.

Este estudo objetivou inicialmente caracterizar o valor nutritivo das proteínas da farinha cozida integral do novo cultivar "IAC-Carioca 80 SH", através da determinação da composição aminoacídica e de parâmetros como digestibilidade, valor biológico, quociente de utilização protéica e biodisponibilidade de metionina,

determinados por métodos biológicos, de forma a avaliar se o valor protéico do novo cultivar apresenta diferenças em relação ao cultivar que o precedeu. Caso a retirada da linhagem resultasse em obtenção de uma variedade com qualidade protéica inferior à de sua predecessora, cremos que sua produção deveria ser desaconselhada.

Em seguida, buscou-se avaliar a qualidade protéica das diferentes proteínas do feijão "IAC-Carioca 80 SH". Considerando-se que as diversas proteínas constituintes do feijão apresentam diferenças em relação à composição aminoacídica, digestibilidade e biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais e, conseqüentemente, em relação ao seu valor nutritivo (100,113,114,165,177,179,182, 187,195,200), procedeu-se ao estudo de alguns aspectos da qualidade das proteínas isoladas a partir dos grãos descorticados do feijão, de forma a possibilitar comparações entre o valor nutricional de cada uma delas, considerando-se que a proporção relativa das diferentes frações protéicas do feijão irá determinar a qualidade nutricional das proteínas totais da variedade (104).

A determinação da digestibilidade por métodos *in vitro* e a análise da composição aminoacídica, com enfoque especial sobre a quantidade de metionina biodisponível, serviram de base para o cálculo do valor biológico e da utilização protéica líquida de cada uma das frações protéicas obtidas.

A velocidade e a extensão da liberação de aminoácidos pelas proteases são provavelmente responsáveis pela qualidade nutricional característica das frações protéicas dos feijões (78). Conseqüentemente, buscou-se obter informações acerca de eventuais diferenças existentes entre as mesmas quanto à liberação do aminoácido, de forma a identificar qual(is) dentre elas seriam

responsáveis pela liberação de maiores quantidades de metionina potencialmente disponível para utilização biológica, através da determinação das concentrações presentes nas frações protéicas isoladas, bem como da medida da extensão da liberação de metionina ao longo do processo de digestão enzimática das mesmas, antes e após tratamento térmico.

As informações obtidas nesta pesquisa poderão contribuir para o desenvolvimento de novos cultivares, que contenham em seus grãos quantidades proporcionalmente maiores de proteínas que contribuam com mais metionina potencialmente biodisponível e, portanto, com qualidade protéica superior às variedades existentes, beneficiando assim amplas camadas da população brasileira e latino-americana.

II - REVISAO BIBLIOGRAFICA

As leguminosas são amplamente cultivadas e consumidas em todo o mundo. Dependendo das condições climáticas de cada área, certos tipos tornaram-se predominantes em relação a outros. Na América Latina, os feijões são as leguminosas mais consumidas, fornecendo quantidades significativas de proteínas, calorias e outros nutrientes para as dietas de populações de regiões onde geralmente predominam a subnutrição e a desnutrição (71,187). Um levantamento realizado pela FAO em 1986, mostrou que a produção de feijões correspondia a aproximadamente 27% da produção mundial total de leguminosas (76).

Recentemente, HOSFIELD (93) compilou os resultados da pesquisa realizada pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT, sobre a produção e o consumo *per capita* aparente de feijão na América Latina na década de 1980. Eles mostram que apesar do Brasil ter produzido 55% do total de feijão da região no período, foi o terceiro país em quantidade consumida por indivíduo (20,1 Kg/*per capita*), atrás do Paraguai e da Nicarágua (24,3 e 23,8 Kg/*per capita*, respectivamente).

Observa-se a ocorrência de grandes variações na ingestão de feijão de região para região e mesmo dentro de um único país. No Brasil, certas áreas rurais do Nordeste podem apresentar um consumo médio diário de 200g, muito superior à média nacional (39). Percebe-se, portanto, a importância do feijão para a nutrição no país, podendo chegar a suprir, em certas regiões, até 30% da ingestão protéica *per capita* do brasileiro (39), ou fornecer em torno de 27 a 31% dos requerimentos diários de proteínas, para uma

parcela significativa de sua população (70).

BRESSANI (23) observa que além de aumentar a quantidade de proteínas na refeição, os feijões contribuem para melhorar em torno de 50 a 70% a qualidade das proteínas da dieta. Isto porque as proteínas de feijão são ricas em lisina, complementando as proteínas dos cereais, como arroz ou milho, sabidamente deficientes deste aminoácido. O fato confere aos feijões uma importância nutricional excepcional, principalmente quando se considera a baixa ingestão de alimentos protéicos pela população de baixa renda, para quem esta leguminosa se constitui em alimento diário.

O conhecimento acerca da composição protéica das diferentes variedades, da natureza de suas proteínas e de suas propriedades nutricionais e antinutricionais assume relevância quando consideramos a contribuição dos feijões para o estado nutricional de grande parte da população brasileira e latinoamericana.

2.1 - DESCRIÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FEIJÃO

As proteínas do grão de feijão são classificadas em albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas, com base na solubilidade (165,202). Geralmente, as albuminas, glutelinas e prolaminas possuem maior valor biológico que as globulinas, por conterem maior quantidade de aminoácidos sulfurados (14,187,202).

As proteínas de feijões são constituídas por dois tipos: metabólicas e de reserva. As primeiras, englobam tanto enzimas responsáveis pela atividade celular normal, como outras proteínas estruturais ligadas a organelas e membranas celulares (165).

As proteínas de reserva constituem fonte de nitrogênio e carbono para a germinação. São abundantemente armazenadas nos corpos protéicos durante o processo de maturação das sementes e não apresentam atividade enzimática. As globulinas, glutelinas e prolaminas são, em geral, proteínas de reserva nutricional. Nas leguminosas predominam as globulinas, enquanto nos cereais observa-se que a maioria das proteínas podem ser classificadas como prolaminas e glutelinas (105,202).

Ao contrário, as albuminas são, principalmente, enzimas e proteínas ligadas ao metabolismo celular, como as lectinas e alguns inibidores de proteases, que parecem estar presentes no grão para inibir a ação de predadores, constituindo uma espécie de defesa do vegetal contra as adversidades do meio (165,181,182,202).

As proteínas do tipo globulina constituem maioria no feijão, ao passo que as albuminas estão presentes em menores quantidades. Juntas, representam até 80% do nitrogênio total dos grãos. A proporção entre globulinas e albuminas varia com o tipo de feijão; dados relativos a diversos tipos de feijão mostram que as primeiras representam de 46 a 81% das proteínas, enquanto as albuminas correspondem entre 15 a 31% do total (165). Estudo realizado por SGARBIERI & GALEAZZI (188) envolvendo 55 variedades de feijões cultivados no Brasil, demonstrou que a razão globulinas/albuminas variou de 1,00 a 3,31 e que, em termos médios, as globulinas representaram em torno de 48% do nitrogênio total extraído, enquanto as albuminas corresponderam a 21% deste total.

As globulinas estão armazenadas em organelas denominadas *corpos protéicos*, estruturas circundadas por membrana lipoprotéica e constituídas por 70 a 80% de proteínas, cerca de 10% de fitatos,

cátions, ácidos nucléicos e concentrações variáveis de oxalatos, carboidratos (exceto amido), lipídios e tocoferóis. Durante o processo de maturação da semente, observa-se um aumento progressivo na síntese das proteínas de reserva, previamente glicosiladas no aparelho de Golgi e secretadas nos vacúolos ou vesículas endoplasmáticas, formando assim os corpos protéicos (46,61,153,192,193). As globulinas são classificadas em dois tipos, em função do seu coeficiente de sedimentação: globulinas 7S e globulinas 11S (202).

A principal proteína do feijão é a globulina G₁, ou faseolina, que apresenta coeficiente de sedimentação 7S e corresponde entre 40 a 50% do total das proteínas contidas nos cotilédones do grão maduro (19,124,165). Em geral, mostram-se mais ricas em aminoácidos sulfurados que as globulinas com coeficiente de sedimentação 11S. A Globulina G₁ do feijão é composta por três tipos de subunidades, com pesos moleculares que variam de 43000 a 53000 daltons (202).

Outras globulinas estão presentes nos cotilédones, ainda que em menores proporções. A legumina, composta por seis subunidades de 50.000 a 60.000 daltons cada e com coeficiente de sedimentação próximo a 11S. Embora se constitua na principal proteína de reserva da maioria das leguminosas, como a glicinina da soja, está presente nos feijões em menor quantidade. É pobre em aminoácidos sulfurados e rica em leucina, glicina e amidas. Globulinas menores também foram isoladas e suas propriedades e características são ainda desconhecidas (42,202,203).

As glutelinas e prolaminas do trigo constituem um grupo de proteínas de composição aminoácídica similar, particularmente

ricas em prolina e aminoácidos sulfurados. Em torno de 30 a 40 % de seus resíduos aminoacídicos são constituídos por aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas. A principal diferença entre elas consiste no fato de que as prolaminas são proteínas constituídas por cadeias polipeptídicas lineares, solúveis em álcool, enquanto as glutelinas são moléculas compostas por agregados protéicos de alto peso molecular, compostos por seis subunidades interligadas por pontes dissulfeto, solúveis em álcalis (127).

Atualmente, considera-se que as glutelinas e prolaminas são proteínas equivalentes. Estudos realizados com as glutelinas do trigo constataram que a maioria de suas subunidades, quando liberadas pela ruptura das pontes dissulfeto, mostraram-se solúveis em álcool, como as prolaminas. A estrutura primária, as concentrações de glutamina e prolina e a estrutura dos genes das subunidades das glutelinas e das prolaminas do trigo, são igualmente semelhantes (127,202).

As glutelinas constituem em torno de 35-40% das proteínas do milho e do trigo, e 80% das proteínas do arroz, estas últimas similares às glutelinas das leguminosas, compostas de maneira semelhante por subunidades, interligadas por pontes dissulfeto (202). Estudo de LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (113) estimou que as glutelinas e prolaminas contribuem, respectivamente, com 22,4 e 1,7 % das proteínas totais do feijão "Carioca 80".

As lectinas formam nos feijões um complexo sistema de glicoproteínas com propriedades eritro- e leucoaglutinantes, de intensidade variável. Podem apresentar atividade mitogênica, produzindo alterações morfológicas nos tecidos pela indução da aceleração do processo de divisão celular. São portanto

responsáveis pela elevada toxicidade apresentada pelos grãos crus de feijões. Constituem cerca de 10% do total de proteínas das sementes, sendo dois terços deste total composto por lectinas. Embora possam ser encontradas nas folhas em pequenas quantidades, são armazenadas principalmente nos cotilédones dos grãos, dentro e fora dos corpos protéicos. São também lectinas algumas proteínas estruturais das membranas destas organelas (87,182).

Fora dos corpos protéicos, estão presentes inúmeras proteínas envolvidas no metabolismo do vegetal e igualmente importantes do ponto de vista nutricional: enzimas diversas, inibidores de enzimas digestivas, algumas lectinas e também oligo- e polipeptídeos de baixo peso molecular. Dentre estas, os inibidores de enzimas digestivas se destacam por serem um dos fatores responsáveis pela baixa digestibilidade apresentada pelos feijões, o que limita seu valor nutritivo. São de dois tipos principais: os inibidores de alfa-amilases e os inibidores de enzimas proteolíticas (182).

As proteínas inibidoras de alfa-amilases estão presentes nos feijões em quantidades variadas. Pesquisadores brasileiros vem estudando inibidores de amilases presentes em espécies de feijões cultivadas no país (67,112,132,179,196). Observa-se, no entanto, que há pouco conhecimento acerca dos inibidores de alfa-amilases presentes nos feijões, bem como de sua verdadeira importância nutricional (166,179).

Os inibidores de tripsina e quimotripsina concentram-se nos grãos, embora possam ser encontrados na folha do vegetal. Em geral, estas proteínas apresentam baixa qualidade nutricional em função de sua composição aminoacídica extremamente limitada, com

quantidades reduzidas de metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano. São particularmente resistentes à desnaturação, sendo que alguns podem apresentar atividade mista, inibindo tanto a tripsina como a quimotripsina (165,182,187). Estudos revelaram que os inibidores de proteases encontrados nos feijões são muito semelhantes aos presentes na soja (181,209).

SGARBIERI & GALEAZZI (188) concluíram após analisarem 55 variedades de feijões que a fração albumina apresenta maior atividade antitriptica que a fração globulina, e que enquanto a fração albumina tem maior ação inibidora sobre a quimotripsina, as globulinas têm maior ação sobre a tripsina.

As diversas variedades de *Ph. vulgaris* apresentam grande variabilidade e complexidade entre suas frações protéicas. SATHE *et al.* (165) destacam que, a despeito dos progressos alcançados na área da química estrutural, muito pouco se conhece acerca das proteínas dos feijões:

i) suas proteínas não foram ainda totalmente sequenciadas;

ii) ainda não foi conhecida a base bioquímica que explicaria a grande diversidade existente entre as variedades e,

iii) o desconhecimento da composição dos m-RNA envolvidos na síntese protéica dificulta a realização de melhoramentos genéticos para aumentar a qualidade nutricional de suas proteínas.

2.2. VALOR NUTRITIVO DAS PROTEINAS DE FEIJAO

Os feijões são considerados boa fonte protéica em função de sua quantidade elevada de proteínas em relação aos demais grãos.

A qualidade de suas proteínas, no entanto, não é satisfatória.

2.2.1. *Teor protéico*

Os resultados obtidos por diferentes pesquisadores que determinaram o teor protéico dos feijões, apresentam grandes variações, inclusive dentro de uma mesma variedade. Estas diferenças podem resultar do emprego de técnicas distintas de determinação, mas podem também refletir variações na composição química em função de fatores ambientais, como a localização geográfica, o grau de maturação em que o feijão foi colhido ou as condições e o tempo de armazenamento. Diferenças no teor protéico ocorrem mesmo entre grãos individuais com relação a sua posição na planta: aquelas colhidas na porção superior do vegetal apresentam um teor protéico 18% menor, em média, que as colhidas nos nodos inferiores (165,195,200).

DE MORAES & ANGELUCCI (37) determinaram o teor protéico das 12 variedades de feijão mais comumente cultivadas no Brasil, encontrando uma variação de 21,5 a 28,3%, o que representa uma concentração média de 25% de proteínas nos grãos. SGARBIERI & GALEAZZI (188) calcularam uma concentração média de 28,5% de proteína, nas 55 variedades analisadas.

Recentemente, SGARBIERI (187) compilou os dados obtidos por nove diferentes pesquisadores, no Brasil e no exterior, totalizando 51 variedades de feijões. O teor protéico variou de 18 a 29%. As variedades "Piratã", "Iguaçu" e "Goiano Precoces" continham teor protéico superior a 27%, enquanto as variedades "Preto", "Roxinho" e "Bico de Ouro", muito consumidas no país,

apresentaram os menores teores, próximos a 21%. "Jalo", "Carioca" e "Mulatinho" continham entre 23 e 26% de proteínas.

Deve-se salientar que muitos dos cultivares analisados são provenientes de pesquisas agronômicas que visam melhorar a produtividade ou o valor nutritivo dos grãos, incluindo-se aí a produção de variedades com maior quantidade de proteínas.

2.2.2. *Composição aminoacídica*

As proteínas de feijão são sabidamente limitadas em aminoácidos sulfurados e triptofano, ricas em lisina e, muitas vezes, em treonina e fenil alanina, conforme demonstram os resultados de diversos estudos (11,14,37,71,72,99,100,101,104,109, 165, 179,182,187,195).

Estudos de KANAMORI *et al.* (109) sobre a composição aminoacídica das proteínas de duas variedades de feijão cultivadas em Burma e no México, mostraram que os teores de lisina, leucina e aminoácidos aromáticos totais encontrados superavam o padrão FAO/WHO 1973. Por outro lado, suas proteínas eram particularmente limitadas em metionina, triptofano e treonina e, em menor proporção, também em valina.

TANDON *et al.* (195) determinaram a composição aminoacídica em 25 variedades de feijão com importância nutricional na América Central. Verificaram que a concentração de lisina era elevada em todos os cultivares e que, da mesma forma, todos continham quantidades reduzidas de metionina e triptofano, cujas concentrações variavam de 0,80 a 1,39 g % e de 0,56 a 0,94 g %, respectivamente.

A composição aminoacídica de 12 variedades cultivadas no Brasil foi determinada por DE MORAES & ANGELUCCI (37). Concluíram, por comparação com o padrão FAO/WHO 1973, que estes cultivares são ricos em lisina e treonina e limitados em metionina, triptofano, leucina, isoleucina e valina.

TOBIN & CARPENTER (200) compararam os dados sobre composição aminoacídica das proteínas de feijões, obtidos por 51 pesquisadores, com o padrão FAO/WHO 1973. Constataram que os feijões em geral contêm excesso de lisina e são particularmente deficientes em aminoácidos sulfurados. No entanto, concluíram que outras deficiências aminoacídicas, regularmente observadas, não são, aparentemente, de relevância nutricional, com base na constatação de que a simples adição de metionina é suficiente para elevar os valores do quociente de eficiência protéica (ou "*Protein Efficiency Ratio*"-PER) e da utilização protéica líquida (ou "*Net Protein Utilization*"-NPU) de maneira satisfatória, a despeito da digestibilidade reduzida. Da mesma forma, suas proteínas não apresentam resposta significativa perante suplementação com outros aminoácidos, ainda que com triptofano, que é o segundo aminoácido limitante.

2.2.3. Digestibilidade

Estudos levados a termo com ratos em crescimento, alimentados com feijões crus, tem invariavelmente como resultado a ocorrência de pouco ou nenhum crescimento, além de elevada mortalidade entre os animais, em consequência da presença nos grãos de fatores tóxicos e antinutricionais. Paralelamente, a reduzida

digestibilidade das proteínas desta leguminosa influencia negativamente o seu valor nutritivo.

TOBIN & CARPENTER (200) e SATHE *et al.* (165) relacionaram os resultados de vários estudos sobre a qualidade protéica de feijões cozidos, realizados com animais em crescimento. Os primeiros observaram que a digestibilidade é de 77% em média, variando de 70 a 85%, inferior à de outras leguminosas e da maioria dos alimentos vegetais, que apresentam digestibilidade média de 90%.

Estudos sobre a digestibilidade dos grãos cozidos de cultivares brasileiros de feijão apresentam, no entanto, valores inferiores, ou seja, uma variação de 52 a 77% (7,38,47,56,114,115,177, 178,179,180,184,187).

Embora raros, experimentos realizados em humanos tem tido resultados semelhantes àqueles obtidos com animais em crescimento: a digestibilidade aparente variou de 49,6 a 62,1%, quando feijões cozidos suplementados com 0,5% de metionina constituíam a única fonte protéica da dieta oferecida aos 12 adultos participantes do estudo (24).

Diversas hipóteses tem sido formuladas para explicar a reduzida digestibilidade dos feijões cozidos, destacando-se:

i) *presença residual de inibidores de proteases*: alguns destes inibidores mostram-se resistentes à desnaturação térmica (55,98,144,158,175,178,180,182,187). A farinha integral e a fração de albuminas do cultivar Rosinha G₂ apresentam baixa digestibilidade, primariamente atribuída à presença de quantidades elevadas de um inibidor de tripsina e quimotripsina, particularmente resistente ao calor (45,113,178);

ii) presença de proteínas resistentes à ação enzimática:

SEIDL *et al.* (175) isolaram de uma variedade de feijão uma globulina extremamente resistente à hidrólise enzimática, mesmo após desnaturação por uréia ou calor, concluindo que ela deveria ser responsável pela reduzida digestibilidade da proteína total dos grãos. A resistência ao ataque enzimático apresentada por esta globulina foi atribuída à sua conformação específica: uma molécula extremamente compactada, o que dificultaria o pleno acesso das enzimas a seus sítios específicos de ataque hidrolítico. Tratamento térmico drástico ou utilização de reagentes capazes de romper as ligações dissulfídicas aumentaram substancialmente a proteólise. Com efeito, ROMERO & RYAN (162) identificaram na Globulina G1, quando em seu estado nativo, a existência de um número relativamente grande de peptídeos com alto peso molecular e resistentes à digestão enzimática;

ii) ação de substâncias não-protéicas: sítios hidrolíticos das proteínas podem ser bloqueados pela formação de certos tipos de ligações químicas entre aminoácidos de cadeias laterais e compostos normalmente presentes nos grãos, como taninos, açúcares redutores, aldeídos e cetonas em geral, alguns componentes da fibra dietética, substâncias como fitatos e alguns íons metálicos (4,24,25,97,143,144,157,161,162,175,177,179,180,182,199).

A presença de taninos reduz a digestibilidade *in vitro* das proteínas de feijão (4,162). Por serem relativamente estáveis ao tratamento térmico, os polifenóis contribuem decisivamente para que as proteínas dos feijões apresentem digestibilidade *in vitro* reduzida, por formarem com elas complexos insolúveis menos susceptíveis à ação enzimática, mesmo após a cocção da leguminosa

(144,157). Sob este aspecto, a globulina G1 parece ser a mais afetada dentre as proteínas dos feijões (162).

As cascas dos grãos apresentam menor digestibilidade que o feijão integral e seu endosperma, provavelmente em função de conterem quantidades relativamente elevadas de componentes fenólicos. Alimentos preparados a partir de feijões descascados apresentam maior digestibilidade, sendo mais recomendados para programas de alimentação infantil, como a merenda escolar (97). Alguns estudos têm mostrado uma correlação inversa entre a pigmentação dos feijões e sua digestibilidade (25,97).

LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (115), estudando a digestibilidade da globulina G1 e das albuminas de feijão, sugeriram que a concentração elevada de glicídes nestas frações poderia induzir reações de condensação carbonil-amina, resultando na formação de estruturas não digeríveis pelas enzimas digestivas. Estes autores observaram que os animais alimentados com feijão integral apresentaram excreção elevada de nitrogênio fecal (aproximadamente o dobro da excreção observada nos que receberam dieta de caseína), contribuindo assim para que as proteínas de feijão tivessem um aproveitamento nutricional reduzido.

Referências têm sido feitas à influência de alguns componentes da fibra dietética, particularmente das fibras solúveis, sobre a digestibilidade das proteínas de feijão. Existem evidências de que elas promovem, em ratos, um aumento significativo na excreção fecal de nitrogênio com consequente redução na digestibilidade da proteína (115,143,144).

Coerentemente, DE ANGELIS & OROZCO (34), a partir de um estudo realizado com homens de 19 a 21 anos, constataram uma

diminuição na digestibilidade da proteína, bem como redução no balanço de cálcio e zinco, quando os indivíduos receberam dietas compostas basicamente por arroz e feijão, suplementadas com alimentos de origem vegetal, sabidamente ricos em componentes solúveis da fibra dietética. Com base nestes resultados, os autores sugeriram o reestudo das recomendações de nutrientes para dietas que contenham feijão.

Ainda que haja referências aos fitatos como componentes dos feijões, passíveis de sofrerem interações com proteínas e assim reduzirem sua digestibilidade (161,165), estudos recentes concluíram que a quantidade de fitatos presente nos feijões não é suficiente para interferir na digestibilidade das proteínas (43).

O tratamento térmico resulta em melhoria do valor nutritivo dos feijões, pois aumenta a digestibilidade de suas proteínas. No entanto, esta melhoria é condicionada por fatores como temperatura, tempo de cocção e condições de armazenamento, dentre outros.

A cocção dos feijões promove um aumento significativo na digestibilidade de suas proteínas, condicionado tanto pela temperatura e tempo de cozimento, como pela umidade da amostra (96). LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (113) constataram um aumento significativo na digestibilidade protéica *in vitro* após tratamento dos feijões por 30 minutos a 121°C. Os valores de 17 a 40% de digestibilidade, apresentados pelos feijões crus, aumentaram para 69 a 72% após a cocção.

Após considerarem as consequências sobre a digestibilidade de diferentes tipos de tratamentos térmicos aplicados em feijões, BRENES *et al.* (22) recomendaram que os grãos

sejam previamente imersos em água, pelo período de uma noite, o que permitirá a cocção em condições mais brandas. Afirmam que a cocção a 121°C , por 10 a 30 minutos, é suficiente para que a digestibilidade e o valor nutritivo das proteínas sejam elevados ao máximo; e que a cocção caseira (por 4 horas e sem panela de pressão) tem efeito similar à autoclavagem, mas não inativa completamente os fatores antinutricionais.

A principal proteína do feijão, a globulina G1, mostra-se resistente à hidrólise *in vitro* pela pepsina, tripsina e quimotripsina, quando em seu estado nativo. Estudos de VAINTRAUB *et al.* (204,205) demonstraram que apenas 2,4 e 15% das ligações peptídicas da globulina G1 são rompidas, respectivamente, pela pepsina e tripsina. A maior parte da molécula permanece intacta e o pesos moleculares dos produtos de degradação variam de 22.000 a 30.000 daltons (44,120). NIELSEN *et al.* (145) sugeriram que a clivagem pelas endopeptidases ocorreria em um ponto central da superfície externa das sub-unidades da globulina G1, onde se concentram resíduos hidrofílicos da molécula, mais susceptíveis ao ataque enzimático.

O tratamento térmico resulta em aumento expressivo na digestibilidade da globulina G1 (44,120,162). Aparentemente, induz ao rompimento das estruturas terciária e quaternária da proteína, sem causar, no entanto, alterações significativas em sua estrutura secundária; o bastante, porém, para permitir maior exposição de sua porção hidrofílica ao meio aquoso, criando condições para que se verifique um aumento significativo na ação enzimática (43). Com efeito, LIENER & THOMPSON (120) demonstraram que o grau de hidrólise da proteína tratada termicamente é semelhante ao da

caseína, quando hidrolisada pela tripsina ou quimotripsina, é superior ao da caseína, quando tratada pela pepsina.

Da mesma forma, a digestibilidade *in vitro* das glutelinas do feijão é aumentada expressivamente pelo tratamento térmico (113).

No entanto, aparentemente, nem todas as proteínas do feijão tem sua digestibilidade melhorada pela cocção. Alguns autores observaram que a fração de albuminas do feijão pode ter sua digestibilidade reduzida pelo tratamento térmico, provavelmente em função da ocorrência de interações proteína-proteína induzidas pelo calor, que levariam à formação de agregados protéicos de alto peso molecular, não digeríveis pelas proteases (45,113). Com efeito, LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (113) constataram que os resíduos da digestão da fração autoclavada de albuminas, pelo sistema pepsina-pancreatina, continham peptídeos com pesos moleculares elevados, variando de 14.000 a 20.000 daltons.

Entretanto, parece haver alguma controvérsia a respeito, uma vez que outros pesquisadores observaram aumento na digestibilidade de albuminas extraídas de diferentes feijões após tratamento térmico das frações (7,166).

A hidrólise enzimática das ligações peptídicas pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten, seguindo o modelo cinético de reação de pseudo-primeira-ordem (94).

Alguns estudos demonstraram que a liberação de peptídios das proteínas de feijões cai drasticamente após as 6 primeiras horas da digestão proteolítica *in vitro* (160,183).

2.2.4. Biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados

Além da reduzida digestibilidade e da deficiência em aminoácidos sulfurados e triptofano, as proteínas de feijão apresentam também baixa biodisponibilidade de aminoácidos sulfurados, particularmente metionina, o que contribui decisivamente para seu baixo valor nutritivo.

A biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados em proteínas de feijões é limitada por uma série de fatores, dentre os quais destaca-se a presença nos grãos de inúmeras substâncias com natureza antinutricional, como inibidores de proteases, polifenóis, fitatos e lectinas, dentre outros. As proteínas podem interagir com vários componentes do próprio grão durante os processos de estocagem e processamento, bem como com componentes de natureza semelhante contidos em outros alimentos durante a digestão, como lipídios e seus produtos de oxidação, ácido fítico e seus sais, e diversos minerais. Consequentemente, pode ocorrer a formação de complexos não assimiláveis pelo organismo ou mesmo a destruição de seus aminoácidos, em graus variáveis, reduzindo assim a utilização de suas proteínas (118,165,182,187).

A biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados em proteínas de feijão pode também ser diminuída em função de fatores como tempo e condições de armazenamento (7,27,54).

A presença de agentes oxidantes pode contribuir para a redução da biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados, os quais podem interagir com produtos de oxidação de lipídios poliinsaturados. A armazenagem em condições de umidade elevada estimula a formação de compostos como peróxidos de linoleato nos

grãos, que podem reagir com o grupo metionil e, conseqüentemente, levarem à formação de compostos carbonila, resultantes da degradação dos peróxidos, como também em perdas das quantidades de metionina disponível nos grãos (197).

Isto ocorre porque a metionina nos alimentos é facilmente oxidada a um monóxido, o sulfóxido de metionina (Met-O), e a partir deste composto, ante a presença de oxidantes mais fortes, é novamente oxidada ao dióxido correspondente, a metionina sulfona (103,126). Esta oxidação a sulfona é essencialmente irreversível, ao contrário do que se observa em relação ao Met-O que, em certos casos, pode ser reduzido a metionina (26). A metionina sulfona não é utilizada biologicamente (33,146,148).

O sulfóxido de metionina encontra-se presente nos alimentos em concentrações variáveis. A transformação não enzimática dos resíduos de metionina dos alimentos em Met-O pode ocorrer, de forma limitada, sob a ação de processos oxidativos brandos durante o transporte, estocagem e processamento dos alimentos, bem como nos processos de extração e modificação de alimentos não convencionais (33,126,147,197).

Esta oxidação está diretamente relacionada com a perda da atividade biológica das proteínas, pela redução da biodisponibilidade de metionina, particularmente nos alimentos e proteínas onde esse aminoácido essencial é limitante (26,29,33,58,134,148).

CUQ *et al.* (33) trataram leite com peróxido de hidrogênio e observaram que aproximadamente 51% dos resíduos de metionina presentes em suas proteínas foram oxidados a Met-O, o que resultou em redução de 30% na biodisponibilidade da metionina, quando

determinada a partir de digestão enzimática *in vitro*.

ELLINGER & PALMER (58) observaram que a utilização líquida das proteínas da caseína foi reduzida consideravelmente após tratamento com peróxido de hidrogênio, em parte devido à menor digestibilidade da caseína oxidada, mas também em função da presença de "peptídeos não disponíveis" contendo sulfóxido de metionina.

FORD & SHORROCK (79) demonstraram que estes peptídios podem ser parcialmente absorvidos, mas são excretados na urina. Outros autores confirmaram que a formação de sulfóxido de metionina em uma proteína resulta na redução da liberação de metionina por hidrólise enzimática, de forma inversamente proporcional à concentração de Met-O presente, provavelmente em função da incapacidade das enzimas em romper ligações de resíduos onde o sulfóxido tenha sido formado (33).

A biodisponibilidade do Met-O é incerta e controversa (126,148,207). Alguns estudos demonstram que o sulfóxido de metionina, em sua forma livre, é utilizado biologicamente pelos ratos em proporção variável, relacionada com a idade do animal. É indisponível nutricionalmente durante o período de aleitamento e muito pouco utilizado durante os primeiros dezessete dias após o desmame, conforme mostram os ensaios de curto termo realizados por MILLER *et al.* (138). Da mesma forma, os resultados de CHANG *et al.* (29) confirmam as observações de que o Met-C não é utilizado de forma significativa por ratos em crescimento, especialmente no período em que são normalmente empregados nos ensaios biológicos de avaliação da qualidade protéica.

A utilização do Met-O aumenta com o crescimento do animal, melhorando quando adulto (29,136,137,138,146), quando pode apresentar atividade biológica equivalente a aproximadamente 66% da L-metionina, segundo determinação de ANDERSON *et al.* (6) em ratos, ou variando de 52 a 82% de acordo com KUSMICKY *et al.* (111), que consideram para a avaliação da utilização biológica por frangos, as tres formas de sulfóxido de metionina que poderiam estar presentes nos alimentos (L-, D- e D,L-Met-O).

MILLER *et al.* (137) sugerem, no entanto, que esse aumento na utilização poderia ser consequência da adaptação dos animais à dieta experimental, em função da longa duração de alguns destes estudos e, possivelmente, das características das dietas formuladas, que poderão conter quantidades excessivas do composto, muitas vezes superiores às quantidades usualmente presentes nos alimentos. Foram identificadas em microrganismos e em alguns tecidos animais dois sistemas distintos, capazes de reduzir o Met-O a metionina; entretanto, não existem evidências de sua existência em humanos (26).

Parece que hoje já se tem estabelecido que a oxidação da metionina a Met-O não é a causa principal da indisponibilidade nutricional do aminoácido (6,44,45,56,60,115,120,140,169,182,187). A metionina é particularmente muito estável perante as condições passíveis de oxidação nos processos industriais usuais e portanto, a formação do sulfóxido tende a ser bastante reduzida.

Particularmente em relação às leguminosas, onde a metionina é o aminoácido limitante, é importantante considerar que esta indisponibilidade esta fundamentalmente relacionada com:

i) a existência de estruturas compactas, em suas proteínas, que são resistentes à ação proteolítica;

ii) a presença residual nos grãos processados de inibidores de proteases, afetando a digestibilidade e, consequentemente, a liberação enzimática do aminoácido, e

iii) a presença residual de fitohemaglutininas ativas, que podem aumentar a excreção de nitrogênio endógeno. Em consequência de ruptura das células do epitélio intestinal, pode ocorrer perda acentuada de nitrogênio endógeno paralelamente a uma desordem generalizada no intercâmbio de nutrientes, resultando em redução na eficiência do processo de retenção metabólica dos aminoácidos (38,55,106,184,187)

Poucos estudos têm sido publicados acerca dos efeitos da temperatura e do tempo de cocção do feijão sobre a biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados contidos em suas proteínas. Sabe-se que a cisteína não resiste a tratamentos térmicos moderados e, consequentemente, sua destruição implica em comprometimento parcial da metionina disponível, já escassa no grão, que é desviada metabolicamente em função da necessidade de se produzir cisteína, agravando a deficiência do primeiro aminoácido (107,187,200).

Por outro lado, sabe-se que o tratamento térmico reduz significativamente a quantidade de lisina disponível nas proteínas dos grãos, em consequência da ocorrência de reação de Maillard, resultando no bloqueio de grupamentos aminolaterais por compostos do tipo carbonil, formados durante a oxidação das gorduras ou com grupos carboxílicos livres de aminoácidos como os ácidos glutâmico ou aspártico (55,96,182).

FORD & SALTER (78) verificaram que o tratamento térmico tem efeito marcante sobre a biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados, influenciando sua liberação enzimática *in vitro*, de forma específica, em cada uma das frações de proteína de peixe estudadas. Os diferentes sistemas enzimáticos testados apresentaram resultados semelhantes e, ao mesmo tempo, razoável correlação com ensaios biológicos (ratos), microbiológicos e químicos. Evidências indicaram que a velocidade e a extensão da liberação de lisina e de aminoácidos sulfurados *in vitro* eram, provavelmente, responsáveis pelo valor biológico característico de cada fração.

Em relação aos percentuais de metionina biodisponível encontrados em proteínas de feijões, parece estabelecido que eles não ultrapassam o limite de 58% do total, com base na análise de resultados obtidos por diversos pesquisadores a partir de ensaios com animais.

EVANS *et al.* (63) constataram que ratos alimentados com feijões cozidos excretavam nas fezes 49% da metionina e 25% da cisteína ingeridas. Observaram também que para promover um bom crescimento dos animais, a quantidade de metionina necessária para suplementação da proteína de soja era inferior à do feijão, apesar das concentrações semelhantes deste aminoácido encontradas em ambas as proteínas. Concluíram, portanto, que os aminoácidos da proteína do feijão são menos utilizados que os da proteína da soja. Estes autores observaram a existência de estreita correlação entre o PER e a biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados nas proteínas estudadas.

Em estudo posterior, EVANS & BAUER (64) usaram a técnica do balanço metabólico, em ratos, para determinar a

biodisponibilidade de metionina no "Navy Bean" (*Ph. vulgaris*, L.). Constataram que a metionina adicionada em suplementação era completamente absorvida pelos animais e que a biodisponibilidade da metionina no feijão era 50%.

EGGUM *et al.* (57) determinaram a digestibilidade verdadeira de diversos aminoácidos, em 17 tipos de alimentos, por balanço metabólico de 5 dias. Em relação à metionina, os valores encontrados demonstraram que este aminoácido é relativamente bem absorvido em praticamente todos os alimentos testados (de 80 a 98% de digestibilidade), com exceção de feijões enlatados, onde apenas 51% do total ingerido pelos animais era absorvido. Em estudo semelhante, SARWAR *et al.* (163) avaliaram a digestibilidade verdadeira dos aminoácidos em 20 alimentos diferentes, constatando, também, que a absorção da metionina nos feijões é a menor dentre todos os alimentos testados. Os valores registrados em feijões comuns e na variedade "Pinto" foram, respectivamente, 44 e 45% de absorção da metionina.

MCDONOUGH *et al.* (131) compararam a regressão da curva de crescimento de ratos alimentados com uma dieta padrão, com a regressão obtida a partir do registro do ganho de peso de ratos que receberam outra dieta contendo proteínas de 16 tipos de alimentos; a metionina biodisponível foi expressa percentualmente em relação ao padrão. A disponibilidade mostrou-se elevada em todos os produtos (88-100%), exceto no feijão (var. "Pinto"), que apresentou em torno de 58 % de metionina biodisponível.

Os estudos realizados por pesquisadores brasileiros em variedades cultivadas no país, utilizaram a metodologia desenvolvida por SGARBIERI *et al.* (178), baseada na resposta de

crescimento dos animais frente à ingestão de dietas com diferentes níveis de metionina. Os resultados dos ensaios realizados em quatro variedades brasileiras de feijão, variaram de 29,3 a 40,6% de metionina biodisponível.

ANTUNES & SGARBIERI (7) constataram uma biodisponibilidade de 46,3% de metionina nos grãos da variedade "Rosinha G2", observando que este valor decrescia proporcionalmente com o aumento da temperatura e da umidade do ar durante a estocagem.

SGARBIERI (177) observou que as várias frações protéicas do "Rosinha G₂" contém diferentes quantidades de metionina biodisponível. As globulinas, assim como a farinha integral e o isolado protéico total continham quantidades superiores de metionina disponível que as albuminas extraídas.

SGARBIERI *et al.* (186) determinaram a quantidade de metionina biodisponível em 12 variedades de feijão por ensaio biológico, encontrando quantidades de metionina biodisponível que variavam de 0,23 a 0,77 g/100g de proteína. DURIGAN (55,56) também determinou o percentual de metionina biodisponível em 12 variedades brasileiras de feijão, encontrando valores que variavam de 23,9 a 40,2% da concentração total de metionina presente nos grãos.

Em relação ao cultivar "Carioca 80", que precedeu ao "IAC-Carioca 80 SH", objeto de estudo neste trabalho, TEZOTO & SGARBIERI (198) avaliaram em 56,8% o percentual de metionina biodisponível, destacando o fato de que este era o maior valor encontrado em cultivares brasileiros, até então.

2.2.5. Utilização das proteínas do feijão

Em consequência da baixa qualidade de sua composição aminoacídica, as proteínas do feijão possuem, em geral, valor biológico reduzido, podendo variar de 9,1 a 79%, segundo compilação de SGARBIERI (187), ou de 44 a 68%, com valor médio de 64%, segundo TOBIN & CARPENTER (200). Por outro lado, algumas substâncias presentes nos grãos podem afetar a digestibilidade de suas proteínas e, consequentemente, sua utilização.

Com efeito, os valores de NPU determinados em ensaios onde o feijão constitui a única fonte de proteína da dieta, são inferiores a 50% para a grande maioria dos cultivares estudados.

TOBIN & CARPENTER (200) analisaram os dados relativos à utilização das proteínas de feijões, obtidos por 28 pesquisadores. Os valores de PER para os feijões suplementados foram muito baixos, e variaram de 0,4 a 1,68. Os valores de NPU foram igualmente baixos, em torno de 46%, em média, com variação de 38 a 53%. A suplementação com metionina elevou significativamente os valores médios de PER e NPU para 3,0 e 61%, respectivamente.

SGARBIERI *et al.* (180) estudaram a eficiência protéica das diferentes frações protéicas do feijão "Rosinha G₂", com e sem suplementação com metionina. O PER variou de 0,50, para a fração albumina, a 0,98 para a globulina, e a suplementação com 3% de metionina e 2% de cisteína elevou os valores para 3,98 e 4,47, respectivamente.

Estudos sobre a utilização das proteínas do feijão com humanos são escassos. BLANCO *et al.* (16) avaliaram a qualidade protéica de três variedades de feijão pelo método do balanço

nitrogenado de curto prazo, em 12 adultos. Encontraram grande variação entre os indivíduos, concluindo que a ingestão de 0,65 g/Kg de peso corporal de proteína de feijão, como a única fonte de proteínas da dieta, mesmo quando suplementada com 0,5% de metionina, não mantinha o balanço nitrogenado dos mesmos. Os valores de NPU determinados na experiência foram 35,0, 31,6 e 37,2% para os feijões preto, vermelho e branco, respectivamente.

LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (115) realizaram ensaios biológicos para avaliar a qualidade nutritiva da farinha integral e das frações isoladas de feijão (*Ph. vulgaris*), tratadas termicamente. Constataram que as albuminas e as glutelinas têm melhor qualidade nutricional que as globulinas ou a farinha integral. Albuminas e glutelinas apresentaram digestibilidade intermediária, inferior à da caseína, e valores do quociente de razão protéica líquida (ou "*Net Protein Ratio*"-NPR) de 3,18 e 2,91, respectivamente. Apesar da elevada digestibilidade, a globulina G1 apresentou um NPR de apenas 1,51, provavelmente em consequência de sua limitação em aminoácidos sulfurados.

2.3. COMPOSIÇÃO AMINOACIDICA COMO BASE PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA DAS FRAÇÕES

Observa-se atualmente um grande interesse em estabelecer uma metodologia para a avaliação da qualidade protéica *in vitro*, que se constitua em alternativa aos métodos biológicos, invariavelmente caros e de duração prolongada. Como observa WALKER (206), os métodos *in vitro* são menos demorados e requerem menores quantidades de amostra, possibilitando maior número de análises

por unidade de tempo.

A propósito, ainda em 1963, SHEFFNER (189) observou que os índices de aminoácidos tendiam a superestimar o valor determinado experimentalmente *in vivo*, quando não consideravam a disponibilidade dos aminoácidos limitantes nas proteínas em estudo.

Em 1975, um comitê "oficioso" estabelecido pela FAO/WHO para o estudo das necessidades de energia e proteínas recomendava que a qualidade biológica das proteínas dos alimentos de origem vegetal ou animal fosse avaliada a partir do cômputo de aminoácidos de suas proteínas, corrigido pela digestibilidade real e/ou pela disponibilidade dos aminoácidos limitantes, dadas as excelentes correlações verificadas entre diversos métodos *in vitro*, existentes até então, com os métodos biológicos disponíveis (73). Nas situações aonde estas não pudessem ser determinadas, o grupo de peritos sugeria a utilização de dados presentes na literatura ou de valores médios de digestibilidade por eles compilados, relativos a diversos alimentos de origem vegetal ou animal.

Recentemente, BODWELL *et al.* (18) coordenaram um estudo colaborativo sobre métodos de avaliação da qualidade protéica, demonstrando que as determinações *in vitro* se constituem em alternativas adequadas para uma estimativa segura. Na oportunidade, revisaram as conclusões das diversas reuniões do "FAO/WHO Codex Committee on Vegetable Protein" (CCVP), organizado pela FAO, a partir de 1980, com a finalidade de estabelecer parâmetros e padrões relativos a várias características alimentares, dentre estas a qualidade nutricional das proteínas, com vistas à regulamentação das trocas internacionais de alimentos. Os autores relatam a existência de um consenso acerca das limitações e

impropriedade da utilização do PER, índice oficial para avaliação da qualidade protéica, nos Estados Unidos e Canadá. Mencionam que, já a partir de 1984, as conclusões destes encontros vinham se direcionando pela opção por métodos baseados em dados sobre a composição aminoacídica, corrigidos pela digestibilidade da proteína e/ou pela biodisponibilidade de seus aminoácidos.

Com efeito, o CCVP vem publicando as conclusões de seus estudos, em que consideram a utilização de índices aminoacídicos corrigidos como a forma mais adequada para estimar a qualidade de proteínas e alimentos protéicos em geral. O comitê recomenda explicitamente que na avaliação da qualidade de proteínas sabidamente limitadas em aminoácidos sulfurados, como as leguminosas, a correção das concentrações de metionina e cisteína seja feita pelo percentual de biodisponibilidade dos aminoácidos sulfurados (75,77).

Conclui-se, portanto, que a determinação das concentrações de aminoácidos sulfurados disponíveis nas proteínas, torna-se fundamental para que a qualidade protéica das leguminosas seja avaliada de maneira precisa.

2.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE A DETERMINAÇÃO DE METIONINA

Em relação à biodisponibilidade da metionina em proteínas de feijões, observa-se que sua determinação por ensaios biológicos pode ser baseada:

- i) no balanço metabólico do aminoácido (57,63,64,163);
- ii) na resposta de crescimento de animais perante suplementação da dieta à base de feijão como única fonte protéica

com níveis crescentes de metionina (7,55,56,177,178,186,198);

iii) pela comparação entre o crescimento de animais alimentados com dietas a base de feijão e o crescimento de animais que receberam dieta contendo uma proteína padrão (131).

Enquanto a primeira forma de avaliação considera apenas a digestibilidade aparente ou verdadeira do aminoácido, ignorando a ocorrência de eventuais interações pós-absortivas que podem afetar a retenção efetiva do aminoácido pelo organismo, as demais procuram avaliar a biodisponibilidade do aminoácido de forma mais completa.

Os ensaios biológicos, usualmente empregados para a determinação da metionina biodisponível em proteínas ou alimentos protéicos, normalmente expressam seus resultados em termos do percentual encontrado do aminoácido disponível para utilização biológica, calculado em relação à quantidade total contida nas proteínas avaliadas (7,64,84,111,131,163,178).

Com efeito, a concentração de metionina total não oxidada é o parâmetro a partir do qual é possível calcular o percentual de metionina biodisponível, com base na quantificação *in vitro*, para comparação posterior com suas concentrações determinadas *in vivo*. O conceito de metionina total implica em considerar a quantificação completa dos resíduos de metionina, liberados após o rompimento de todas as suas ligações peptídicas, o que não acontece durante a hidrólise enzimática, quando são excretados, nas fezes, resíduos de metionina contidos em peptídeos não absorvidos.

Em relação à determinação de metionina biodisponível, é importante considerar apenas os resultados capazes de expressar as quantidades reais de metionina não-oxidada presentes na amostra, com base na constatação da incerteza ainda existente acerca do

verdadeiro papel nutricional do Met-O, de sua importância, provavelmente secundária, no processo fisiológico e bioquímico da utilização da metionina, bem como na completa indisponibilidade biológica da metionina sulfona. Os métodos de ensaio devem ser capazes de discriminar a metionina não oxidada de seu sulfóxido (122,126).

Parece não haver dúvidas acerca da impropriedade do procedimento de hidrólise ácida, seguida da determinação da metionina por cromatografia de troca iônica e por reação colorimétrica. Pode-se hoje afirmar, com certeza, que as concentrações de metionina estimadas a partir de metodologias que utilizam hidrólise ácida estão subestimadas (80,126,147,200,207).

JENNINGS & LEWIS (102) comprovaram uma perda de até 59% do aminoácido contido em proteínas submetidas ao processo de hidrólise ácida. Estudos que compararam as quantidades de metionina em feijões, determinadas por metodologias diferentes, demonstraram a impropriedade deste procedimento, pois a quantificação da concentração de metionina em hidrolisados ácidos apresenta resultados significativamente inferiores aos obtidos por outros métodos (186,198). Existem evidências de que o Met-O é reduzido a metionina em HCl 6N a quente e na ausência de ar, ao passo que, na presença de oxigênio, pode ocorrer a oxidação parcial da metionina a sulfóxido; podem também ser formadas pequenas quantidades de produtos de transmetilação, como sais do tipo sulfônio de metionina (80,126,147,159,207).

A oxidação da metionina a metionina sulfona pelo ácido perfórmico, seguida de hidrólise ácida e determinação da concentração de sulfona por cromatografia de troca iônica

(100,125,141), tem sido a forma mais comum de determinação de metionina total em diversos alimentos, inclusive feijões (29,35,56,113,117,128,178). Seus resultados, no entanto, não expressam a quantidade total de metionina não oxidada presente nas proteínas analisadas.

Como observam DUNCAN *et al.* (51,52), na medida em que quantifica a metionina sulfona formada pela oxidação, o método do ácido perfórmico não diferencia a metionina não oxidada de suas formas oxidadas; seu resultado representa a soma das quantidades de metionina, Met-O e metionina sulfona pré-existentes na amostra. Desconsidera também, as interconversões destes componentes, as quais ocorrem durante a hidrólise ácida, o que é particularmente importante para a compreensão atual acerca da oxidação da metionina e seu efeito deletério sobre o valor nutricional das proteínas (80,126,207).

Quando se necessita liberar todos os resíduos de metionina visando a quantificação de sua concentração total em uma proteína, a hidrólise alcalina se constitui em alternativa adequada à hidrólise ácida. Alguns autores vêm utilizando este processo para a determinação da metionina em proteínas e alimentos diversos (31,33,105,147,159). Não foram encontradas referências acerca de sua utilização em feijões.

Os tratamentos alcalinos podem modificar a metionina, em função da racemização do aminoácido (117). Entretanto, não foram encontradas referências na literatura acerca da existência de algum tipo de estéreo-especificidade do aminoácido se mostrasse necessária para a ação antioxidante da Cloramina-T. Com efeito, observa-se que alguns estudos realizados sobre a oxidação da

metionina a Met-O, utilizam D,L-metionina como substrato para as reações de oxidação e obtém resultados quantitativos (90,103). O resultado da determinação de metionina no hidrolisado alcalino independe, portanto, da ocorrência de racemização durante o processo.

Por outro lado, há evidências de que o aminoácido não sofre perda significativa durante os tratamentos térmicos realizados sob condições alcalinas. DE GROOT & SLUMP (35) estudaram o efeito de diferentes tratamentos alcalinos sobre diversos aminoácidos e destacam que as concentrações de metionina foram praticamente constantes em todos os tratamentos. NJAA (147) comparou métodos para a determinação de metionina total e, dentre estes, o que associa hidrólise alcalina seguida de determinação colorimétrica da metionina por um reagente iodoplatinado, foi o que apresentou menor coeficiente de variação, tendo sido recomendado pelo autor, inclusive para análises de rotina.

A quantificação dos aminoácidos essenciais liberados pelas enzimas digestivas *in vitro*, tem sido considerada a opção mais adequada para estimar a concentração de aminoácidos essenciais biodisponíveis, em substituição aos ensaios biológicos, caros e demorados (129,191).

Parece estabelecido que a pequena utilização biológica dos aminoácidos sulfurados é decorrência de interações que envolvem seus grupos funcionais e, no caso da metionina, sua baixa disponibilidade parece estar relacionada com a alteração química do grupo tiometil de sua cadeia lateral. Deve-se considerar que interações entre grupos funcionais de aminoácidos vizinhos podem dificultar o acesso da enzima a ligações peptídicas, caso se

encontrem estericamente bloqueadas (121).

Em geral, os métodos descritos para a determinação *in vitro* dos aminoácidos sulfurados biodisponíveis utilizam um sistema enzimático que apresenta boa correlação com a digestibilidade observada *in vivo*, e quantificação da concentração do aminoácido não oxidado presente no hidrolisado, por técnicas diversas (13,28,38,62,78,85,108,128,154,155,160,171,172,186,198,212).

A quantificação da metionina não oxidada tem sido feita basicamente de duas maneiras: pela reação com o nitroprussiato de sódio e determinação colorimétrica do complexo formado, em método originalmente descrito por McCARTHY & SULLIVAN (130), ou pela quantificação por cromatografia gasosa do metiltiocianato resultante da reação do brometo de cianogênio com a metionina não oxidada (8,20,51,59,68).

O primeiro tem sido modificado, seja para melhorar sua pequena sensibilidade, ou para eliminar interferências existentes na reação de coloração por substâncias normalmente presentes em feijões, como alguns metais (13,123,130). O segundo, requer alguns equipamentos de segurança para a manipulação de substâncias tóxicas, o que pode trazer problemas para as análises de rotina e, além disso, faz-se necessário um tratamento prévio das amostras que envolve a extração de substâncias interferentes que estão presentes nos feijões, como a gama-glutamil-S-metil cisteína (50,52,197).

Em 1976, SHECHTER *et al.* (176) demonstraram que a Cloramina-T é um reagente capaz de oxidar seletivamente metionina a Met-O e cistina a ácido cistéico, em meio neutro ou levemente alcalino (7,0-8,5). A metionina é um nucleófilo fraco, resistente à protonação em todas as faixas de pH (1-14) e é o aminoácido mais

sensível à oxidação por ácidos contendo halogênio ativo, dentre os quais, a Cloramina-T destaca-se como um dos mais seletivos (26,176).

Com base nestas observações, TROUT (201) desenvolveu um método rápido e com boa sensibilidade para a determinação de metionina não oxidada em hidrolisados protéicos, baseado na oxidação da metionina em pH 8,0 a Met-O, por excesso conhecido de Cloramina-T.

A concentração do aminoácido é então estimada a partir da quantidade remanescente de oxidante, medida por titulação direta com determinação fotométrica do ponto final a 246 nm, ou de forma indireta, colorimetricamente a 412 nm, a partir da descoloração resultante da oxidação do ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (NTB) a ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DNFB). Segundo este autor, esta última opção tem sensibilidade dez vezes maior.

O tratamento prévio da amostra com dietilpirocarbonato (DEPC), em pH 8,0, garante a eliminação de possíveis interferentes, como grupos amino livres, presentes em hidrolisados ácidos ou alcalinos, triptofano, e também grupos sulfidríla dos resíduos de cisteína, que são acilados quantitativamente. Estes autores obtiveram recuperações entre 98,2 e 99,4% de metionina com a determinação colorimétrica, em misturas que continham quantidades conhecidas de diversos aminoácidos.

III - MATERIAL E METODOS

3.1 - CULTIVAR

Foram utilizados grãos do cultivar denominado "IAC-Carioca 80 SH", safra 1989, fornecidos pela Estação Experimental de Campinas, do Instituto Agrônômico de Campinas.

3.2 - PREPARO DAS FARINHAS

3.2.1 - *Feijão Integral Autoclavado (FIA)*

Os grãos foram macerados em água (1:3 p/v) por uma noite à temperatura ambiente. Após descarte da água, eram novamente colocados em água (1:3 p/v) e autoclavados por 10 min a 121°C. Após resfriamento rápido em banho de gelo e liofilização, com a água de cocção, foram moídos em moinho de facas e de martelo até apresentarem granulometria de 80 mesh. Até o momento de uso, a FIA foi armazenada a -20°C, em frascos hermeticamente fechados.

3.2.2 - *Feijão Cru Descorticado (FCD)*

Os grãos, depois de macerados em água por 12 h à temperatura ambiente e, após descarte da água, eram descorticados. Após liofilização, foram moídos em moinho de facas e de martelo até apresentarem granulometria de 80 mesh. Até o momento de uso, a FCD foi armazenada a -20°C, em frascos hermeticamente fechados.

3.3 - ENSAIOS BIOLOGICOS

3.3.1- *Balanço de nitrogênio (BN), valor biológico (VB), quociente de utilização líquida da proteína (NPU) e digestibilidade, aparente (Dap) e verdadeira (Dv)*

Para a determinação do balanço nitrogenado foram utilizados dois grupos com seis ratos Wistar, machos e recém-desmamados. Um dos grupos recebeu dieta aprotéica; o outro, uma dieta contendo 10% de proteína fornecida pela FIA.

A composição das dietas utilizadas no ensaio é apresentada no Quadro 1.

QUADRO 1 - Composição das dietas com 10% de proteínas (P) e aprotéica (A), utilizadas no ensaio biológico para a determinação do VB, NPU, Dv e Dap na farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado (FIA)

COMPONENTES (g/100g)	P	A
Proteína a	10,0	-
Oleo vegetal b	8,0	8,0
Mistura salina c	4,0	4,0
Mistura vitamínica d	2,0	2,0
Celulose	3,0	3,0
Carboidrato e	73,0	83,0

a = fornecida pela FIA;

b = óleo de soja;

c = preparada segundo a AOAC (12);

d = preparada segundo a NBC (149);

e = amido de milho + sacarose (3:1).

O alinhamento do peso dos animais foi feito com base no sistema de blocos casualizados (15). Foram formados seis grupos, cada um deles representando uma faixa de peso, com dois animais cada um, selecionados de acordo com seu peso para o grupo correspondente. Um animal de cada grupo foi sorteado, de forma a compor cada um dos dois grupos, de acordo com o número de tratamentos utilizados no ensaio.

O peso médio dos animais dos grupos submetidos à dieta com 10% de proteína e aprotéica foi de $41,6 \pm 2,28$ e $42,2 \pm 1,2g$, respectivamente.

Durante o período do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com alimentação e água *ad libitum*. A temperatura ambiente era mantida a 25°C e o ciclo noite-dia de 12 h, controlado automaticamente.

Inicialmente, os animais permaneceram por 5 dias em adaptação, recebendo as dietas experimentais. A partir de então, por outros cinco dias, foram coletadas a urina e as fezes dos animais de ambos os grupos, medindo-se o consumo de ração no período. Foi desenvolvido um sistema especial para a alimentação dos animais, o que possibilitou a coleta de fezes e urinas limpas, praticamente sem contaminação pela ração.

Os índices foram calculados considerando-se o nitrogênio endógeno excretado na urina e nas fezes, determinado a partir do grupo que recebeu dieta aprotéica, bem como o nitrogênio de origem alimentar não digerido, excretado pelos animais que receberam dieta com proteína fornecida exclusivamente pela farinha de feijão integral autoclavado. O teor de nitrogênio da urina e das fezes foi determinado pelo método semimicro de Kjeldhal.

O balanço de nitrogênio (139), a digestibilidade, aparente e verdadeira (210,211), o valor biológico verdadeiro (139) e o quociente de utilização líquida da proteína (135,156,185), foram determinados com base nas relações :

$$BN = NI - [(NF - NF_e) + (NU - NU_e)]$$

$$D_{ap} = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

$$D_v = \frac{NI - (NF - NF_e)}{NI} \times 100$$

$$VB = \frac{NI - [(NF - NF_e) + (NU - NU_e)]}{NI - (NF - NF_e)} \times 100$$

$$NPU = \frac{NI - [(NF - NF_e) + (NU - NU_e)]}{NI} \times 100$$

onde:

NI = nitrogênio ingerido;
 NF = nitrogênio fecal;
 NF_e = nitrogênio fecal endógeno;
 NU = nitrogênio urinário;
 NU_e = nitrogênio urinário endógeno.

3.3.2 - *Estimativa do teor de metionina biodisponível na farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado: variação do ganho de peso e do quociente de eficiência protéica operacional (PER_{Op}), em função da adição, à dieta, de quantidades crescentes de metionina.*

Utilizou-se, exceto quanto à forma de quantificação, o procedimento sugerido por SGARBIERI *et al.* para a determinação de metionina biodisponível em feijões, por método biológico (178,185).

Foram formados seis grupos com cinco ratos Wistar, machos, com 23 a 26 dias de idade, mantidos em gaiolas individuais, com água e alimentação *ad libitum*, por um período de 28 dias, com temperatura ambiente mantida a 23°C e o ciclo noite-dia, controlado automaticamente.

O alinhamento do peso dos animais foi feito a partir de blocos casualizados (15). Foram formados cinco grupos, cada um deles representando uma faixa de peso, com seis animais cada um, selecionados de acordo com seu peso para o grupo correspondente. Um animal de cada grupo foi então sorteado, compondo desta forma seis grupos, conforme o número de tratamentos utilizados no ensaio.

Os pesos médios dos animais para os grupos I a VI (Quadro 2), foram, respectivamente, $68,6 \pm 12,3$, $72,6 \pm 15,6$, $69,4 \pm 9,0$, $70,4 \pm 14,6$, $69,2 \pm 12,0$ e $72,8 \pm 12,3g$.

Todas as dietas utilizadas no experimento eram isocalóricas e isoprotéicas. Um dos grupos recebeu dieta contendo 10% de proteínas fornecidas pela FIA e suplementada com 1,0% de L-cisteína, em base protéica. Os outros grupos receberam a mesma dieta, suplementada com mais 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% de L-metionina, em base protéica (grupos I a VI, respectivamente). A composição das dietas empregadas é apresentada no Quadro 2.

QUADRO 2 - Composição das dietas utilizadas no ensaio do quociente de eficiência protéica operacional da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado (FIA) *

COMPONENTES	I	II	III	IV	V	VI
Proteína ^a	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Oleo vegetal ^b	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Mistura salina ^c	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Mistura vitam. ^d	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Celulose	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Carboidrato ^e	73,0	73,0	73,0	73,0	73,0	73,0
L-Cisteína ^f	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-Metionina ^f	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

* = valores expressos em g/100g da dieta (exceto ^f);

^a = fornecidas pela FIA;

^b = óleo de soja;

^c = preparada segundo a AOAC (12);

^d = preparada segundo a NBC. (149);

^e = amido de milho + sacarose (3:1);

^f = valores expressos em g/100g de proteína.

O consumo alimentar dos animais foi registrado diariamente e, ao final do período do ensaio, registrou-se o ganho de peso médio dos animais dos diversos grupos, de forma a estabelecer sua correlação com o teor de metionina adicionada em cada um dos tratamentos.

Da mesma forma, buscou-se correlacionar a metionina adicionada em cada tratamento com o PER_{op} correspondente a cada um deles. O total de proteína ingerida no período foi determinado a partir do teor de proteínas das rações ($N \times 6,25$) e empregado nos cálculos do PER_{op} :

$$PER_{op} = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

Considerou-se nesse ensaio que os animais tiveram seus requerimentos de metionina alcançados quando o ganho de peso dos animais e o PER_{Op} foram máximos.

Com base nos requerimentos de metionina para ratos em crescimentos (208), e no valor correspondente à menor quantidade de metionina adicionada às dietas, capaz de elevar esses índices a seu maior valor, procedeu-se à estimativa do teor de metionina biodisponível:

$$Mb = 2 - Ma$$

onde:

Mb = metionina biodisponível (g/16g N);
 2 = teor de metionina nas dietas (g/16g N) equivalente à quantidade mínima do aminoácido requerida por ratos em crescimento;
 Ma = menor teor de metionina adicionada às dietas (g/16g N) que induz ganho de peso e PER_{Op} máximos.

3.4 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES CRUAS E TRATADAS TERMICAMENTE

3.4.1- *Fracionamento*

Inicialmente, buscou-se isolar frações solúveis em condições fracamente ácidas, predominantemente compostas por globulina G1 (G1) e lectinas/inibidores de proteases (LIP).

Para isso, porções de FCD eram extraídas por 1 h (1:10 p/v) sob agitação contínua com NaCl 0,5M:HCl 0,025M (192). A seguir, a suspensão era centrifugada a 12.000xg por 20 min a 5°C, obtendo-se o resíduo I e o sobrenadante I, como mostra a Figura 1.

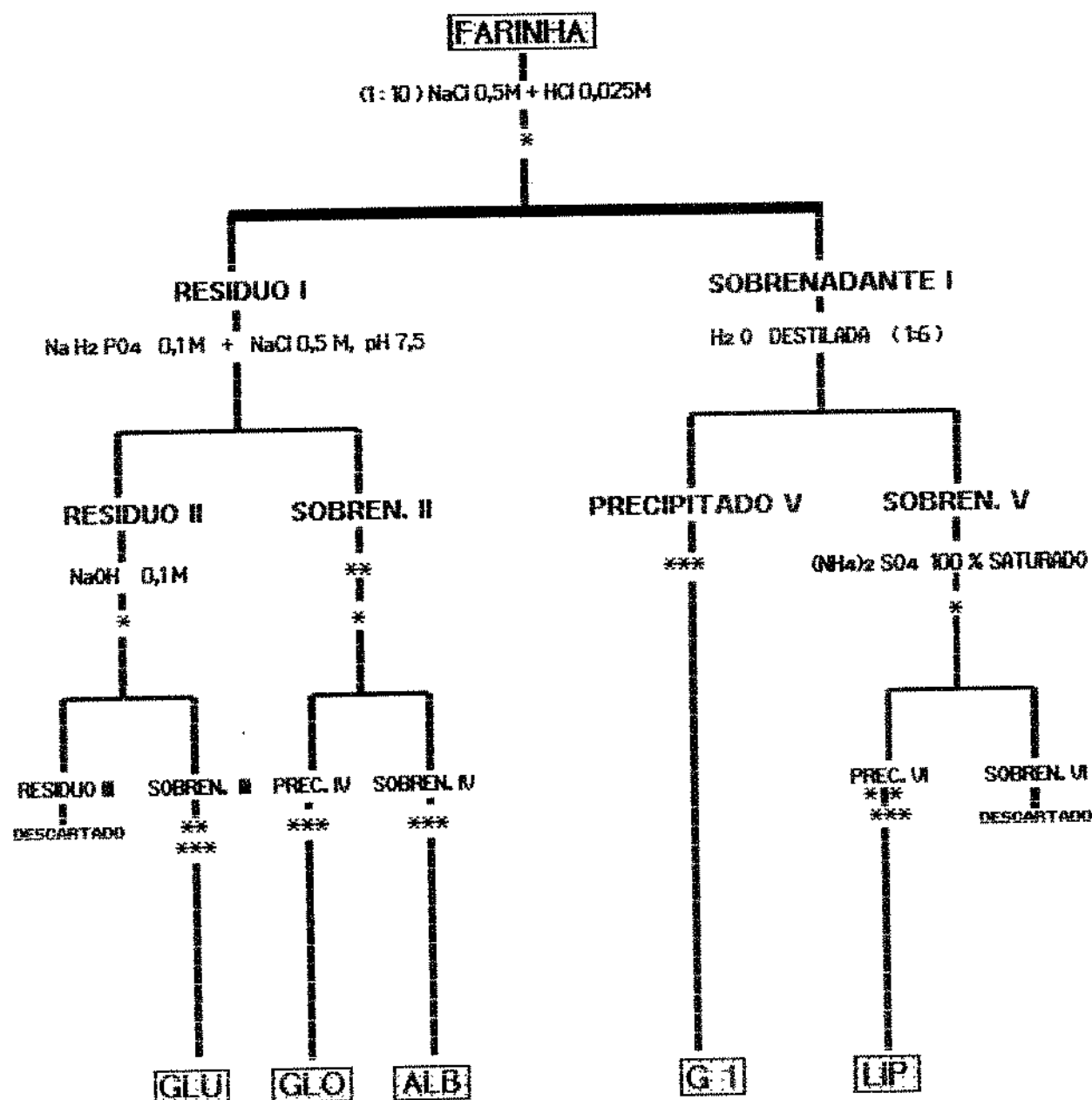


FIGURA 1 - Esquema do fracionamento utilizado para a obtenção das frações protéicas (GLU = glutelinas; GLO = globulinas; ALB = albuminas; G1 = globulina G1 e LIP = lectinas/inibidores de proteases).

* centrifugação a $12000\times g$

** diálise contra água destilada (72 h, 5°C)

*** liofilização

As proteínas solúveis, presentes no sobrenadante I, foram fracionadas por diluição em água destilada (1:6), induzindo à precipitação da globulina G1 por redução da força iônica do meio, do qual era separada por centrifugação e em seguida liofilizada, constituindo-se na fração G1 (88,192).

Albuminas muito solúveis, basicamente lectinas e inibidores de proteases, permaneciam no sobrenadante.

A fração LIP foi obtida a partir do tratamento deste sobrenadante com sulfato de amônio a 100% de saturação, resultando na precipitação das proteínas nele contidas, do qual eram separadas por centrifugação (12.000xg por 20 min a 5°C) e dialisadas contra água destilada por 72 h, a 5°C e sob agitação constante. Foram, em seguida, liofilizadas.

O resíduo I, resultante da primeira extração, foi reextraído com uma solução contendo 0,1M de fosfato monossódico mais 0,5M de NaCl, a pH 7,5. Após centrifugação (12.000xg, 20 min, 5°C) obteve-se o resíduo II e o sobrenadante II.

O sobrenadante II, contendo albuminas e globulinas solúveis em soluções fracamente alcalinas, foi dializado contra água destilada. Também aqui, a redução da força iônica no meio induziu a precipitação das globulinas. Após centrifugação do dialisado, o precipitado resultante (IV) foi liofilizado, constituindo-se na fração globulinas (GLO).

Paralelamente, a fração de albuminas (ALB) foi obtida após liofilização do sobrenadante (IV).

O resíduo II contendo proteínas insolúveis em condições fracamente básicas ou ácidas foi então extraído com NaOH 0,1N, por 1 h à temperatura ambiente e sob agitação constante.

Desta forma, a fração glutelinas (GLU) foi obtida por centrifugação do extrato alcalino, seguida de diálise do sobrenadante III contra água destilada e liofilização do dialisado.

O resíduo insolúvel resultante (III), contendo basicamente amido, proteínas insolúveis e substâncias da fração fibra dos grãos, dentre outras, foi descartado.

3.4.2- Tratamento térmico das frações protéicas

As frações obtidas pelo fracionamento da FCD foram diluídas em água (1:3 p/v) e autoclavadas por 10 min a 121°C. Após resfriamento rápido em banho de gelo eram liofilizadas e, em seguida, moídas em liquidificador sob alta rotação até apresentarem granulometria de 80 mesh. Até o momento de uso, as frações foram armazenadas a -20°C, em frascos hermeticamente fechados.

3.5 - ANALISES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS

3.5.1- Composição química centesimal

Os teores de proteínas (Nx6,25), extrato etéreo e cinzas foram obtidos de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (12). Após determinação do teor de fibra bruta (151), os carboidratos foram calculados por diferença.

3.5.2- Composição aminoacídica

3.5.2.1- Farinhas de feijão cru descorticado (FCD) e feijão integral autoclavado (FIA).

Com exceção da metionina, cisteína e triptofano, os conteúdos dos outros aminoácidos foram determinados em um analisador Beckman 119 CL, operando com resina W-3H, empacotada em coluna de 22cm.

Alíquotas da amostra foram hidrolisadas com HCl 6N, por 22 h a $110 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e, após evaporação completa do ácido à vácuo, diluídas, filtradas e analisadas de acordo com a metodologia básica de SPACKMAN *et al.* (190).

Procurou-se minimizar a variabilidade da análise utilizando-se a norleucina como padrão interno, adicionando-a ao frasco de reação previamente à hidrólise. Empregou-se o HCl 6N previamente desaerado com nitrogênio gasoso por 3 min para a eliminação do oxigênio presente no meio de reação (69).

A relação entre as áreas dos picos de cada aminoácido e a de seu padrão, após correção pela norleucina, foi utilizada para o cálculo da composição aminoacídica das farinhas:

$$g_{AA}/16g\ N = \frac{Ar\ AA \times PM\ AA \times 0,0625}{Ar\ STD \times P\% \times P} \times kn$$

onde:

$$kn = \frac{Ar\ NLEU\ STD}{0,833 \times Ar\ NLEU\ AM}$$

sendo :

Ar AA = área do aminoácido no cromatograma-amostra;
 Ar STD = área do aminoácido no cromatograma-padrão;
 PM AA = peso molecular do aminoácido;
 P% = percentagem de proteína na amostra;
 P = peso da amostra (g);
 0,833 e 0,0625 = fatores de diluição e transformação de unidade;
 Kn = fator de correção pela norleucina;
 Ar NLEU STD = área da norleucina no cromatograma-padrão;
 Ar NLEU AM = área da norleucina no cromatograma-amostra.

A percentagem de recuperação dos aminoácidos nos cromatogramas foi calculada segundo SATTERLEE *et al.* (167):

$$\% \text{ RECUPERAÇÃO} = \frac{S \text{ gN } \%}{16} \times 100$$

onde:

$$\text{gN } \% = \frac{\text{g AA } \% \times 14 \times \text{n}^{\circ} \text{ N/AA}}{\text{PM AA}}$$

sendo:

gN % = gramas de nitrogênio em cada aminoácido por 100g de proteína da amostra;

S gN % = somatória de gN %;

g AA % = teor calculado de cada aminoácido (g/100g de proteína da amostra);

n^o N/AA = número de átomos de nitrogênio de cada aminoácido;

PM AA = peso molecular de cada aminoácido.

Para o cálculo da composição aminoacídica, foram considerados apenas os cromatogramas que apresentaram recuperação superior a 90%. Para efeito de comparação entre as farinhas e as frações protéicas, os resultados, com exceção dos obtidos para metionina, cisteína e triptofano, foram corrigidos para 95% de recuperação.

3.5.2.2- Frações protéicas cruas e autoclavadas.

Com excessão de metionina, cisteína e triptofano, os aminoácidos foram determinados por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (HPLC), pelo método do "Pico-Tag" (91), em um cromatógrafo automático Waters 730, equipado com detector de ultravioleta (comprimento de onda fixado a 254nm) e integrador computadorizado.

Alíquotas da solução-padrão de aminoácidos e das frações protéicas (diluídas em tampão fosfato 0,1M pH 7,2) foram inicialmente hidrolisadas com HCl 6N, sob vácuo, a 110°C por 22 h.

Em seguida, o padrão e as amostras foram tratadas com uma solução etanol: trietilamina: água: fenilisotiocianato (PITC) (7:1:1:1 v/v), por 20 min, à temperatura ambiente. Traços remanescentes de PITC eram removidos pela secagem das amostras sob vácuo.

Os derivados resultantes, resíduos de feniltiocarbamil (PTC)-aminoácidos, foram então separados em 12 min a 38°C, utilizando-se como eluente A uma solução de trietilamina, acetato trihidratado e acetonitrila em água, e como eluente B uma solução aquosa de acetonitrila a 60%.

A relação entre as áreas dos PTC-aminoácidos das amostras e de seus respectivos padrões foi usada para o cálculo da composição aminoacídica das frações protéicas:

$$\text{g AA/16gN} = \frac{\text{Ar AA} \times \text{PM AA} \times \text{PM STD} \times 0,0025}{\text{Ar STD} \times \text{P\%} \times \text{P} \times \text{V}}$$

onde:

Ar AA = área do aminoácido no cromatograma-amostra;
Ar STD = área do aminoácido no cromatograma-padrão;
PM AA = peso molecular do aminoácido;
pM STD = concentração do aminoácido no cromatograma-
padrão (pM);
P% = percentagem de proteína da fração;
P = peso da amostra (mg);
V = volume injetado da amostra (mL);
0,0025 = fator de diluição.

A percentagem de recuperação dos aminoácidos nos cromatogramas foi calculada segundo SATTERLEE *et al.* (167), como descrito no item 3.5.2.1.

No cálculo da composição aminoacídica, foram considerados apenas os cromatogramas que apresentaram recuperação superior a 90%. Os resultados, com excessão dos obtidos para triptofano, metionina e cisteína, foram corrigidos para 95% de recuperação, de modo a facilitar as comparações entre a composição aminoacídica das diversas frações.

3.5.2.3- Determinação de triptofano

Empregou-se basicamente a técnica de ALLRED & MacDONALD (5), com adaptações relativas à quantificação por cromatografia de troca iônica.

Uma alíquota de proteína foi hidrolisada com NaOH 4,2N (previamente desaerado por borbulhamento com nitrogênio gasoso, por 3 min, e contendo 0,01% de 1-octanol), por 20 h a 110°C. Após resfriamento e clarificação por filtração em placa porosa, coberta por areia lavada (31), o hidrolisado alcalino foi

cuidadosamente transferido para um balão de 25mL e neutralizado com HCl 6N. Após resfriamento, completou-se o volume com tampão citrato de sódio pH 4,25.

Uma alíquota do hidrolisado foi então aplicada em um analisador Beckman 119 CL, sendo o triptofano separado em uma coluna de 22cm (W-3H), operando inicialmente por 50 min a 59°C com tampão de citrato de sódio 0,2N pH 4,25 e, em seguida, a 65°C com tampão citrato de sódio 0,14N pH 5,3, até o final da corrida.

As áreas das amostras comparadas com as do padrão de triptofano, serviram de base para a quantificação do aminoácido na FCD, FIA e nas frações protéicas cruas e autoclavadas:

$$\text{TRP (g/16g N)} = \frac{A \text{ TRP AM} \times \text{PM} \times 5}{A \text{ TRP STD} \times P \times P\%}$$

onde:

5 = fator de diluição e transformação de unidade;
 A TRP AM = área de triptofano no cromatograma-amostra;
 A TRP STD = área de triptofano no cromatograma-padrão;
 PM = peso molecular do triptofano;
 P = peso da amostra (g);
 P% = percentagem de proteína na amostra.

3.5.2.4 - *Determinação de metionina total: hidrólise alcalina e quantificação pelo método da Cloramina-T*

Alíquotas de proteína foram hidrolisadas com NaOH 3,75 N (previamente desaerado por borbulhamento com nitrogênio gasoso por 3 min, e contendo 0,01% de 1-octanol), por 14 h a 100°C.

Após este período, o hidrolisado foi resfriado e a seguir clarificado por filtração em placa porosa, coberta por areia lavada (31). A seguir, o hidrolisado foi cuidadosamente transferido para um balão de 25mL e neutralizado com HCl 6N. Após resfriamento, completou-se o volume com tampão fosfato 0,1N pH 8,0 + 0,5mg/mL de EDTA.

O teor de metionina do hidrolisado foi então determinado espectrofotometricamente pelo procedimento de TROUT (201). Aliquotas do hidrolisado eram mantidas em contato com 100uL de solução de dietilpirocarbonato (DEPC) a 10% em acetonitrila, pelo período de uma noite à temperatura ambiente.

Em seguida, foram diluídas com solução de tampão fosfato 0,1M pH 8,0 + 0,5mg/mL de EDTA. Desta solução, aliquotas contendo de 0,01 a 0,05uM de L-metionina (Koch-Light Lab., lote nº 65421) foram diluídas em tampão fosfato + EDTA até que o volume final do meio reativo fosse 2,8mL, e postas para reagir com 100uL de solução de cloramina-T 1mM por 40 min.

Findo o prazo, adicionou-se 100uL de solução de ác. 2-nitro-5-tiobenzóico (NTB) 2 mM, preparada no momento do uso. Paralelamente, foi conduzido um ensaio contendo apenas amostra, utilizado como branco.

A absorção do meio foi medida a 412 nm e utilizada para a quantificação de metionina nas aliquotas, após dedução do valor do branco.

Utilizou-se equação de regressão linear de uma curva-padrão obtida pela correlação entre concentrações de 0,01 a 0,05uM de metionina e suas respectivas absorbâncias, para o cálculo da quantidade de metionina "total" nas amostras:

$$\text{MET (g/16g N)} = \frac{37,3025 \times \mu\text{M MET} \times V_f}{A \times V_h \times P \times P\%}$$

onde:

37,3025 = fator de diluição e transformação de unidade;

$\mu\text{M MET}$ = concentração determinada de metionina (mM);

V_f = volume de diluição de V_h (mL);

A = alíquota de hidrolisado tomada para análise colorimétrica (mL);

V_h = quantidade de hidrolisado tomada para reação com o DEPC (mL);

P = peso da amostra (g);

$P\%$ = percentagem de proteínas na amostra.

Previamente a adoção do método, foram realizados estudos de padronização.

Soluções com concentração conhecida de L-metionina e de uma mistura de L-triptofano, L-cistina e L-metionina foram submetidas à hidrólise alcalina e, posteriormente, tiveram seu teor de metionina determinado pela reação com a Cloramina-T.

Em outro estudo, as mesmas soluções tiveram sua concentração de metionina determinada pelo método da Cloramina-T, sem terem sido submetidas à hidrólise alcalina, de forma a verificar a existência de qualquer efeito nocivo da mesma sobre os aminoácidos em solução.

Paralelamente, determinou-se o conteúdo de metionina da ovalbumina (MERCK), proteína já sequenciada, pelo método que emprega hidrólise alcalina e Cloramina-T. As quantidades determinadas foram comparadas com as calculadas, estabelecendo-se os percentuais de recuperação do aminoácido.

3.5.2.5- Determinação in vitro de metionina biodisponível: hidrólise enzimática e quantificação pelo método da Cloramina-T

Inicialmente, as amostras foram hidrolisadas pelo sistema pepsina-pancreatina, segundo AKESON & STAHPMAN (3), exatamente como descrito no item 3.5.6.

Em seguida, alíquotas deste hidrolisado foram tratadas com DEPC, sendo a metionina determinada segundo TROUT (201), pelo método da Cloramina-T, exatamente como descrito no item 3.5.2.4.

Paralelamente, tomou-se o cuidado de realizar um ensaio aonde apenas as enzimas estavam presentes, de modo a quantificar a quantidade de metionina proveniente das mesmas, em consequência de sua auto-digestão, para dedução posterior da concentração de metionina determinada em cada uma das amostras.

O teor de metionina biodisponível era então calculado com base na fórmula:

$$g \text{ MET}/16g \text{ N} = \frac{74,605 \times uM \text{ MET} \times V_f}{A \times V_h \times P \times P\%}$$

onde:

- 74,605 = fator de diluição e transformação de unidade;
- uM MET = quantidade determinada de metionina (mM);
- Vf = volume de diluição de Vh (mL);
- A = alíquota de hidrolisado tomada para a análise colorimétrica (mL);
- Vh = quantidade de hidrolisado tomada para a reação com o DEPC (mL);
- P = peso da amostra (g);
- P% = percentagem de proteínas na amostra.

3.5.2.6 - Determinação de cisteína

O conteúdo de cisteína das farinhas e frações foi determinado por cromatografia de troca iônica, como ác. cistéico, após oxidação de alíquotas das amostras por ácido perfórmico seguida de hidrólise das proteínas com HCl 6N, conforme metodologia de MOORE (141), adaptada por MacDONALD et al. (125).

Alíquotas das amostras foram tratadas com ácido perfórmico em banho de gelo por 16 h e, em seguida, com HBr a 48% por 30 min. Após evaporação a vácuo, procedeu-se à hidrólise com HCl 6N, previamente desaerado com nitrogênio gasoso, aquecendo-se a seguir por 22 h a $110 \pm 0,5$ °C. Em seguida, o hidrolisado foi evaporado a vácuo e diluído em tampão citrato de sódio pH 2,85.

Após filtração, alíquotas do hidrolisado tiveram seu conteúdo de ácido cistéico determinado por cromatografia de troca iônica, utilizando-se um analisador Beckman 119 CL com resina W-3H empacotada em coluna de 22cm. A temperatura da coluna foi mantida a 48°C com tampão citrato de sódio 0,17N pH 2,85, até o final da corrida.

A concentração de cisteína das amostras foi calculada a partir da comparação das áreas de ácido cistéico nas amostras com as do padrão de ácido cistéico, utilizando-se a norleucina como padrão interno:

$$g \text{ CYS}/16g \text{ N} = \frac{Ar \text{ AC } AM \times 0,1}{Ar \text{ NLEU } AM \times P\% \times P} \times kc$$

onde:

$$k_c = \frac{\text{Ar NLEU STD} \times \text{PM CYS}}{\text{Ar AC STD}} \times 500$$

sendo :

k_c = fator de cálculo para a cisteína;
 Ar NLEU STD = área da norleucina no cromatograma-padrão;
 Ar NLEU AM = área da norleucina no cromatograma-amostra;
 Ar AC AM = área do ác. cistéico no cromatograma-amostra;
 Ar AC STD = área do ác. cistéico no cromatograma-padrão;
 P% = percentagem de proteína na amostra
 P = peso da amostra (mg);
 0,1 e 500 = fatores de diluição.

Determinou-se também, pela mesma técnica, o conteúdo de metionina na farinha integral autoclavada.

O fator de cálculo para metionina (k_m) foi obtido com base nos dados relativos ao aminoácido, nos mesmos cromatogramas em que se determinou a cisteína total.

3.5.3- Atividade do inibidor de tripsina (TIA)

Utilizou-se o procedimento de KAKADE *et al.* (107), optando-se pela benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como substrato para a tripsina.

Aliquotas de FIA e FCD, contendo em torno de 300mg de proteína, foram suspensas em 19mL de água, com pH 7,6, e agitadas por 1 h. Após centrifugação, 1mL do sobrenadante foi diluído em 50mL de água. Amostras das frações protéicas isoladas foram suspensas em tampão Tris 0,05M pH 8,2 (1mg/mL) e usadas para a análise.

A atividade máxima de inibidor foi determinada a partir de uma curva-padrão de tripsina. Aliquotas de 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0mL dos extratos protéicos foram pipetadas em duplicatas no meio de reação contendo BAPNA e tripsina, mantido a 37°C. As unidades de tripsina inibidas pelos extratos (UTI) foram determinadas a partir da absorção das soluções a 410nm.

Correlacionando a atividade do inibidor de tripsina (UTI/mL de extrato) com a quantidade de solução inibidora, obteve-se para cada amostra correlações lineares negativas. Pela extrapolação das curvas com o eixo Y (equivalente a 0,0mL de extrato), foram calculados os valores correspondentes à atividade do inibidor de tripsina de cada amostra.

3.5.4 - *Carboidratos Totais (CT)*

De acordo com metodologia de DUBOIS *et al.* (49), as frações protéicas isoladas do feijão foram tratadas com fenol e ácido sulfúrico, resultando no aparecimento de coloração alaranjada em consequência da reação com os carboidratos presentes.

O teor de carboidratos totais de cada fração, expresso como manose, foi determinado colorimetricamente a 490nm, a partir de uma curva-padrão de hexose, calculada por regressão linear, onde:

$$\text{Carboidratos Totais (mg \%)} = \frac{M \times 2,5}{P}$$

onde:

M = teor de manose (ug/mL);

2,5 = fator de diluição e transformação de unidade;

P = peso da amostra (mg).

3.5.5 - Atividade Hemaglutinante (AHT)

A atividade aglutinante específica (ou *título hemaglutinante/mg de proteína*) de cada uma das frações protéicas foi calculada a partir de observações de coagulação de hemácias em diluições seriadas de preparações com 1mg de proteína por mL, quando em contato com alíquota constante de suspensão de hemácias tripsinizadas a 4%.

O título hemaglutinante representa o inverso da maior diluição capaz de promover aglutinação das hemácias. O método empregado foi basicamente o de LIENER (119), adaptado por JUNQUEIRA & SGARBIERI (106).

3.5.6- Digestibilidade in vitro

Determinada basicamente segundo AKESON & STAHRMAN (3), utilizando-se, porém, o procedimento adaptado por GALEAZZI (82), o qual utiliza um sistema enzimático composto por pepsina/pancreatina e ác. tricloroacético (TCA) para a precipitação da proteína não hidrolisada.

Aliquotas das amostras, mantendo a mesma relação enzima-substrato (1:22) sugerida por GALEAZZI (82), foram incubadas inicialmente com pepsina (Sigma, P6887, lote 50H8155, 3700 unidades/mg prot.) em ácido clorídrico 0,1N, por 3 h a 37°C e sob agitação constante; a seguir, a reação foi interrompida pela adição de NaOH 0,1N. As amostras foram então incubadas por 24 h com pancreatina de porco (Sigma, P1750, lote 58F0575, com atividade = 4 x especificação da USP- "*United States Pharmacopea*") em tampão fosfato 0,1M pH 8,0, a 37°C e sob agitação constante.

Paralelamente, foram conduzidos dois ensaios: um, em que somente as enzimas estiveram presentes, de modo a determinar a quantidade de nitrogênio autodigerida no meio de reação e outro, no qual o substrato foi a caseína de Hammarsten (Merck), de forma a testar a eficiência da hidrólise.

Ao fim do período, as proteínas remanescentes nos hidrolisados foram precipitadas pela adição de TCA a 30%, completando-se o volume para 50mL com TCA a 5%, o que resultava em uma concentração final do mesmo no meio de reação, em torno de 5%. Após centrifugação por 20 min a 12.000xg, alíquotas do sobrenadante, filtradas em papel Whatman nº2, foram usadas para determinação de nitrogênio pelo método semimicro-Kjeldhal.

Correlacionando o nitrogênio total da alíquota utilizada com o nitrogênio contido no hidrolisado, corrigido pelo nitrogênio produzido pela autodigestão do sistema enzimático, calculou-se a digestibilidade:

$$\text{DIGESTIBILIDADE (\%)} = \frac{\text{Nd} - \text{Nb}}{\text{NT}} \times 100$$

onde:

Nd = N digerido (mgN/50mL de hidrolisado);
Nb = N autodigerido (mgN/50mL de hidrolisado);
NT = N total (mgN/g de amostra).

3.6 - PROTEOLISE E LIBERAÇÃO DE METIONINA *IN VITRO*

3.6.1 - *Proteólise*

As frações protéicas isoladas do cultivar IAC-Carioca 80 SH, cruas e tratadas termicamente, foram submetidas à hidrólise pelo sistema pepsina-pancreatina.

Aliquotas das amostras, mantendo a mesma relação enzima-substrato (1:22) sugerida por GALEAZZI (82), foram incubadas inicialmente com pepsina (Sigma, P6887, lote 50H8155, 3700 unidades/mg prot.) em ácido clorídrico 0,1N, por 3 h a 37°C e sob agitação constante; a seguir, a reação foi interrompida pela adição de NaOH 0,1N. As amostras foram então incubadas por 3 h com pancreatina de porco (Sigma, P1750, lote 58F0575 com atividade = 4 x especificação da USP- "*United States Pharmacopeia*") em tampão fosfato 0,1M pH 8,0, a 37°C e sob agitação constante.

A intervalos regulares, as proteínas presentes nos hidrolisados eram precipitadas no frasco de reação, pela adição de TCA a 30%, completando-se o volume para 50mL com TCA a 5%, o que resultava em uma concentração final do mesmo no meio de reação, em torno de 5%. Após centrifugação por 20 min a 12.000xg, alíquotas do sobrenadante, filtradas em papel Whatman nº2, foram retiradas para

acompanhamento do grau de hidrólise e da liberação de metionina biodisponível.

Paralelamente, foi realizado um ensaio onde somente as enzimas estavam presentes, de forma a determinar a quantidade de leucina e metionina liberadas das enzimas, em consequência de sua auto-digestão, para posterior dedução dos valores encontrados nas amostras analisadas.

3.6.2 - Acompanhamento do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise das frações protéicas foi determinado conforme metodologia de ADLER-NISSEN (1), a partir da quantificação dos grupamentos alfa-aminicos liberados durante a proteólise, por reação com o ác. trinitro-benzenosulfônico (TNBS).

Aliquotas dos sobrenadantes, obtidos a partir da precipitação das proteínas remanescentes da hidrólise enzimática pelo TCA, foram diluídas em 7,0mL de solução de dodecil sulfato de sódio a 1%, pré-aquecido a 75°C e mantidas nesta temperatura por 15 min. Após resfriamento, completou-se o volume para 10mL com solução de dodecilsulfato de sódio a 1% e filtrou-se em papel Whatman n°2.

Uma alíquota de 0,25mL desta solução foi diluída em 2,0mL de tampão fosfato pH 8,2 e posta para reagir com 2,0mL de solução a 0,1% de TNBS (solução em água deionizada, preparada no momento do uso), por 60 min, a 50°C e ao abrigo da luz.

Ao final do período, foram adicionados 4,0mL de HCl 0,1N. Após 30 min, procedeu-se à leitura da extinção da solução a 340nm contra o branco da amostra, com o intuito de determinar o conteúdo

dos grupamentos alfa-amino liberados na proteólise.

A quantificação foi realizada a partir da equação de regressão linear de uma curva-padrão obtida pela correlação entre concentrações variando entre 0 e 25uM de L-Leucina e suas respectivas absorbâncias a 340nm, após reação com TNBS.

Para acompanhar o processo de digestão enzimática *in vitro*, calculou-se o grau de hidrólise (GH), a partir dos equivalentes de leucina (uM/g de proteína), liberados por cada unidade de tempo, em função do total de mM de aminoácidos/g de proteína de cada fração protéica (2):

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

onde :

h_{tot} = somatória dos milimoles/g de proteína de cada um dos aminoácidos na respectiva fração protéica;
 h = quantidade de leucina liberada (mM Equiv/g de proteína) a um dado tempo, calculado conforme abaixo:

$$h = \frac{Vh \times uM \text{ LEU} \times 0,1}{P \times P\%}$$

onde:

Vh = volume total do hidrolisado (mL);
 $uM \text{ LEU}$ = quantidade de leucina determinada na alíquota (uM);
 P = peso da amostra (g);
 $P\%$ = percentagem de proteínas da amostra;
 $0,1$ = fator de diluição e transformação de unidade.

3.6.3 - Acompanhamento da liberação de metionina in vitro

A liberação de metionina pelas frações protéicas durante o transcurso da proteólise foi determinada conforme procedimento de TROUT (201), pelo método da Cloramina T.

Aliquotas dos hidrolisados foram retiradas a intervalos regulares do meio de reação, precipitando-se a proteína não hidrolisada pela adição de 1mL de TCA a 30%. Em seguida, completou-se o volume para 5mL com TCA a 5% e centrifugou-se a suspensão a 12.000xg por 10 min. Uma alíquota do sobrenadante foi então posta para reagir com DEPC, por uma noite. No dia seguinte, completou-se o volume para 5mL com tampão fosfato pH 8,0 + 0,5mg/mL EDTA, prosseguindo a determinação pelo procedimento de TROUT (201), exatamente como descrito no item 3.5.2.4.

Os resultados foram expressos em gramas de metionina liberada por 16g de nitrogênio da fração, e também como percentual de metionina liberada por unidade de tempo, tanto em relação à metionina "total" contida na amostra, determinada a partir de hidrólise alcalina (como no item 3.5.2.4), como em relação ao total de metionina biodisponível, previamente determinado em cada fração (como no item 3.5.2.5).

3.7 - INDICES RELATIVOS A AVALIAÇÃO IN VITRO DA QUALIDADE DAS PROTEINAS DA FIA E DAS FRAÇÕES PROTEICAS

3.7.1 - " Valor Biológico Calculado " (VB-C)

O procedimento para o cálculo do "Índice de Aminoácidos Essenciais de Olser Modificado" ("*MEEA index*") (189), foi

denominado neste estudo como "valor biológico calculado" (VB-C).

A partir do padrão-referência de proteína de ovo integral (His =2,6; Lys =7,8; Met+Cys =5,3; Phe+Tyr = 9,3; Leu = 8,8; Ile = 5,9; Val =7,1; Thr = 4,9 e Trp =1,4 g/16g N) (189), calculou-se inicialmente a "razão-ovo" ("*Egg Ratio*" ou "ER") de cada um dos aminoácidos essenciais (AAE):

$$ER = \frac{AAE \text{ amostra (g/16gN)}}{AAE \text{ padrão (g/16gN)}} \times 100$$

onde:

ER = "razão-ovo";

AAE = aminoácidos essenciais;

Os aminoácidos sulfurados foram previamente corrigidos pela biodisponibilidade. O valor de metionina empregado para o cálculo foi aquele determinado como biodisponível (item 3.5.2.5). O teor de cisteína total determinado como ácido cistéico (item 3.5.2.6), foi multiplicado pelo fator 0,44, que representa um percentual médio de cisteína "reativa" ou biodisponível determinados em feijões (128).

Em seguida, fez-se uma correção das ER, pela redução a 100 daquelas que ultrapassaram este valor. Calculou-se então os logaritmos decimais de cada ER corrigida, estabelecendo-se a seguir a média aritmética destes valores. O "MEAA index" ou VB-C corresponde ao antilogaritmo desta média.

3.7.2 - "Coeficiente de Utilização Protéica Líquida Calculado" (NPU-C)

O índice foi calculado, segundo PELLET & YOUNG (152), com base na expressão:

$$\text{NPU-C} = \text{VB-C} \times \text{D}/100$$

onde:

VB-C = "valor biológico calculado " (item 3.6.1);
D = digestibilidade *in vitro* (item 3.5.6).

3.8. TRATAMENTO ESTATISTICO

O delineamento experimental dos ensaios biológicos foi feito segundo BENDER *et al.* (15), pelo sistema de distribuição completamente randomizada (CRD). As médias dos resultados obtidos foram submetidas a análise de variância e, quando diferentes pelo teste *F*, analisadas segundo DUNCAN (53) aos níveis de 95 % ou 99% de confiabilidade.

IV - RESULTADOS

4.1 = COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DE FEIJÃO INTEGRAL AUTOCLAVADO (FIA)

A composição química centesimal da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado, expressa como matéria-seca, é apresentada no Quadro 3.

QUADRO 3 - Composição centesimal da farinha integral do feijão "IAC- Carioca 80 SH" autoclavado

DETERMINAÇÕES	g % a
Proteína	25,99 ± 0,26
Extrato etéreo	1,41 ± 0,02
Cinzas	3,50 ± 0,03
Fibra bruta	5,03 ± 0,13
Carboidratos b	64,07 ± 0,59

a = resultados expressos em matéria-seca e representam a média ± DP de três determinações;

b = calculados por diferença.

4.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 - *Balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (D_{ap}), digestibilidade verdadeira (D_v), valor biológico (VB) e utilização protéica líquida (NPU) da farinha integral autoclavada*

Os dados referentes aos valores médios de nitrogênio ingerido e nitrogênio excretado, fecal e urinário, como também do nitrogênio retido (BN) ao final dos cinco dias, em ratos que receberam dieta aprotéica e experimental utilizados para a avaliação da qualidade protéica da farinha são apresentados no Quadro 4.

QUADRO 4 - Nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio fecal (NF) e nitrogênio urinário (NU) e balanço nitrogenado (BN) de ratos que receberam dieta experimental (DE) e dieta aprotéica (DA)

DETERMINAÇÃO *	DE	DA
NI	534,3 $\pm$ 44,4	-
NF	136,9 $\pm$ 13,5	15,4 $\pm$ 1,5
NU	53,2 $\pm$ 22,9	3,8 $\pm$ 0,8
BN	+ 361,5	- 19,5

* = valores expressos em mg N ; média $\pm$ DP referentes a grupos de 6 animais. Valores relativos à coleta de fezes e urina por um período de 5 dias.
DE: 10% de proteínas fornecidas pela FIA.

Os ratos que receberam o tratamento contendo a farinha autoclavada integral como única fonte dietética de proteína, ingeriram durante os cinco dias de duração do experimento 33,1 $\pm$ 2,7g de ração, suficiente para que apresentassem um ganho de peso médio de 3,3 $\pm$ 0,6g no período.

Constatou-se também que os animais apresentaram um balanço positivo de nitrogênio ao final dos cinco dias, correspondente a uma retenção média de 72,3mg N/dia. Ao contrário, o grupo que recebeu dieta aprotéica apresentou balanço nitrogenado negativo ao final dos cinco dias, equivalente, em termos médios, a uma perda de 3,84 mg N/dia.

A digestibilidade, aparente e verdadeira, o valor biológico e a utilização protéica líquida das proteínas da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado, são apresentados no Quadro 5.

QUADRO 5 - Digestibilidade aparente (D_{ap}), digestibilidade verdadeira (D_v), valor biológico (VB) e utilização protéica líquida (NPU) da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado.

DETERMINAÇÕES *	FIA
D_{ap} (%)	74,1 $\pm$ 3,4
D_v (%)	77,0 $\pm$ 3,2
VB	84,8 $\pm$ 7,7
NPU	68,0 $\pm$ 4,8

* = valores referentes à média $\pm$ DP de grupos de seis animais que receberam dieta contendo 10% de proteínas fornecidas pela farinha integral de feijão autoclavado.

Embora menor em termos absolutos, o valor de digestibilidade aparente não apresentou diferença significativa em relação à digestibilidade verdadeira ($p < 0,05$).

O resultado do valor biológico corresponde ao valor biológico "verdadeiro", já que na sua determinação considerou-se a excreção de nitrogênio fecal endógeno.

4.2.2 - Estimativa do teor de metionina biodisponível na FIA : variação do ganho de peso e do PER_{op} em função da adição de quantidades crescentes de metionina à dieta basal

O Quadro 6 relaciona a metionina adicionada e a quantidade de proteína ingerida pelos animais, com o ganho de peso (GP) e o PER_{op} correspondente a cada um dos tratamentos.

QUADRO 6 - Metionina adicionada (MET), proteína ingerida (PI), ganho de peso (GP) e quociente de eficiência protéica operacional (PER_{op}) *

TRATAMENTO	MET (g/16gN)	PI (g)	GP (g)	PER_{op}
I	0,0	8,74 $\pm$ 1,26	18,5 $\pm$ 3,8	2,12 $\pm$ 0,30
II	0,1	11,21 $\pm$ 1,78	24,4 $\pm$ 1,8	2,18 $\pm$ 0,26
III	0,2	11,53 $\pm$ 0,95	27,6 $\pm$ 7,2	2,40 $\pm$ 0,43
IV	0,3	11,37 $\pm$ 2,68	30,0 $\pm$ 7,9	2,64 $\pm$ 0,27
V	0,4	12,64 $\pm$ 1,52	35,6 $\pm$ 4,2	2,82 $\pm$ 0,17
VI	0,5	11,55 $\pm$ 1,43	32,5 $\pm$ 2,4	2,81 $\pm$ 0,34

* = cada valor representa a média $\pm$ DP referentes a grupos de 5 animais, que receberam por 28 dias somente a dieta básica, formulada com 10% de proteínas fornecidas pela FIA do "IAC-Carioca 80 SH" e suplementada com 1% de L-cisteína (I), ou a dieta básica suplementada com quantidades crescentes de L-metionina (II a VI, respectivamente)

Observou-se que a adição de 0,5% de metionina à ração basal não elevou o ganho de peso dos animais e nem o PER_{op} da ração além dos valores obtidos pela adição de 0,4% de metionina, o que pode ser melhor visualizado na Figura 2.

Concluiu-se que a adição de 0,4% de metionina foi suficiente para elevar o GP dos animais e o PER_{Op} das rações ao máximo. Com base neste valor, o teor estimado de metionina biodisponível na FIA do "IAC-Carioca 80 SH" foi de 1,60g/16g N.

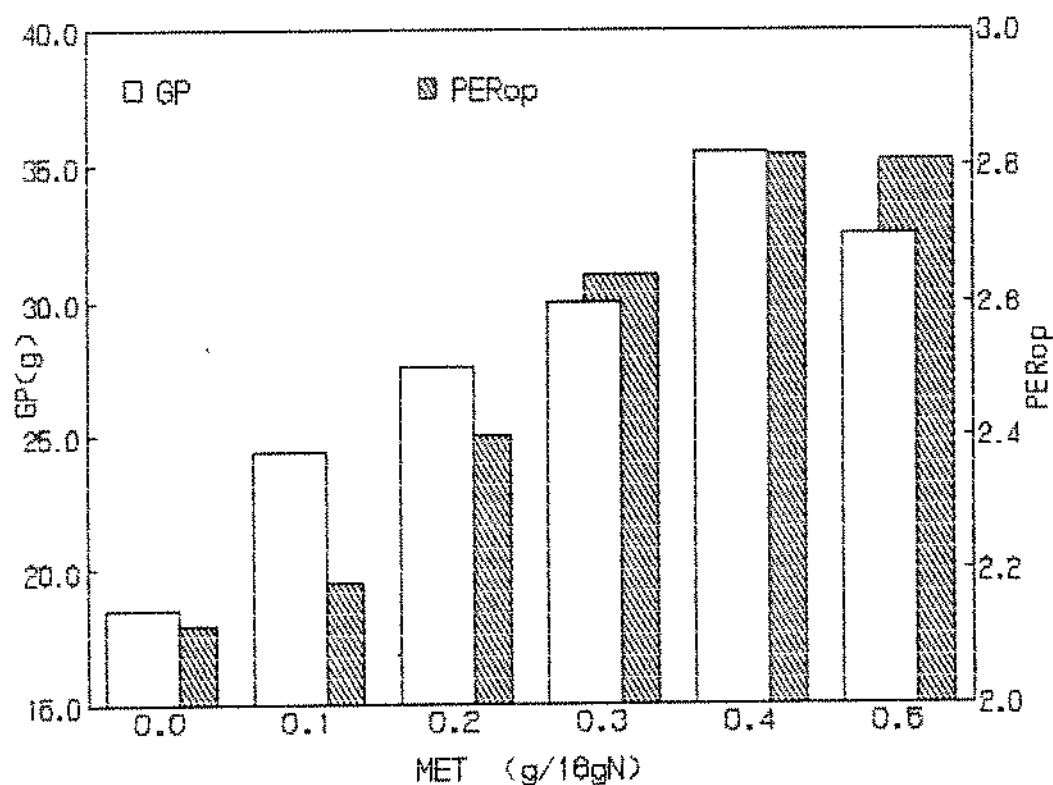


FIGURA 2 - Evolução do ganho de peso (GP) dos animais e do quociente de eficiência protéica operacional (PER_{Op}), em função da suplementação da dieta basal com quantidades crescentes de metionina (MET), em base protéica.

4.3 - COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA DA FARINHA CRUA DESCORTICADA E DA FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO AUTOCLAVADO

O Quadro 7 apresenta a composição aminoacídica das farinhas. A FIA (farinha integral de feijão autoclavado) foi utilizada nos ensaios biológicos e a FCD (crua e descortificada), usada para a obtenção das frações protéicas estudadas.

QUADRO 7 - Composição aminoacídica da farinha crua descortificada (FCD) e da farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado (FIA).

AMINOACIDO *	FCD	FIA
ASP	14,40 ± 0,40	14,02 ± 0,42
TRE	6,00 ± 0,20	5,90 ± 0,19
SER	7,15 ± 0,34	7,00 ± 0,38
GLU	20,60 ± 0,73	20,31 ± 0,80
PRO	4,58 ± 0,16	4,46 ± 0,17
GLY	4,63 ± 0,23	5,00 ± 0,14
ALA	4,76 ± 0,42	5,15 ± 0,18
CYS	0,94 ± 0,04	1,04 ± 0,02
VAL	5,93 ± 0,25	5,41 ± 0,13
MET	2,55 ± 0,03 ^a	3,08 ± 0,06 ^a
ILE	4,93 ± 0,16	5,13 ± 0,23
LEU	8,68 ± 0,31	8,61 ± 0,37
TYR	3,79 ± 0,10	3,45 ± 0,11
PHE	6,46 ± 0,12	6,17 ± 0,12
NH ₃	2,55 ± 0,03	3,08 ± 0,06
LYS	7,27 ± 0,10	7,16 ± 0,29
HIS	3,40 ± 0,06	3,21 ± 0,09
ARG	7,66 ± 0,57	7,35 ± 0,57
TRP	1,22 ± 0,04	1,21 ± 0,02

* = resultados expressos em g/16g N e representam a média ± DP de três determinações. Em uma mesma linha, valores assinalados com uma mesma letra diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

As percentagens de recuperação das análises foram calculadas excluindo-se a metionina, a cisteína e o triptofano, que não foram determinados a partir de hidrólise ácida; seus valores para a FCD e FIA foram, respectivamente, 97,9 e 97,8 %.

Em relação à metionina, os valores referem-se à metionina total das farinhas, determinada por hidrólise alcalina e quantificação da metionina presente no hidrolisado pelo método da Cloramina-T.

Com exceção de metionina, não se constatou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores aminoacídicos da farinha crua descorticada e integral autoclavada.

4.4 - METIONINA TOTAL E BIODISPONIVEL *IN VITRO* NAS FARINHAS CRUA DESCORTICADA E INTEGRAL DE FEIJÃO AUTOCLAVADO

A curva-padrão empregada para a quantificação da metionina foi calculada por regressão linear ($r = 0,9991$).

4.4.1 - Estudos de recuperação.

O Quadro 8 apresenta os resultados dos estudos de recuperação de metionina não-oxidada pelo método da Cloramina-T, a partir da análise de soluções com concentrações conhecidas do aminoácido, isoladamente, ou juntamente com triptofano e cistina.

Constatou-se que a recuperação de metionina foi adequada em ambas as soluções, e que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados da análise de soluções contendo exclusivamente metionina, ou contendo uma mistura de aminoácidos. Consequentemente,

foi confirmada a ausência de interferência de outros aminoácidos eventualmente presentes no meio reativo, na reação colorimétrica.

QUADRO 8 - Percentuais de recuperação de metionina não oxidada, determinados pelo método da Cloramina-T, a partir de soluções de concentração conhecida

AMOSTRA ^a	METIONINA (mg)		RECUPERAÇÃO ^b (%)
	Esperada	Obtida	
I	53,4	51,7 ± 0,7	96,8 ± 1,3
II	32,2	31,8 ± 0,4	98,8 ± 1,1

a = I: somente L-metionina;

II: L-metionina + L-triptofano + L-cistina;

b = resultados representam a média ± DP de três determinações e não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

O Quadro 9 mostra os resultados dos estudos de recuperação de metionina, obtidos a partir de determinações em soluções com concentração conhecida do aminoácido, isoladamente, ou na presença de triptofano e cistina, submetidas à hidrólise alcalina e quantificação no hidrolisado da metionina liberada, pelo método da Cloramina T.

Apresenta também a comparação entre os resultados da determinação, pelo mesmo método, da metionina "total" da ovalbumina, e os valores esperados, calculados com base no número de resíduos de metionina existentes na ovalbumina.

QUADRO 9 - Percentuais de recuperação de metionina determinados, pelo método da Cloramina T, a partir de soluções de concentração conhecida e na ovalbumina, submetidas à hidrólise alcalina

AMOSTRA *	METIONINA		RECUPERAÇÃO ** (%)
	Esperada	Obtida	
I	28,2	26,4 $\pm$ 0,6	93,6 $\pm$ 2,2 ^a
II	34,9	32,9 $\pm$ 0,7	94,2 $\pm$ 1,9 ^a
OV	4,97	4,89 $\pm$ 0,07	98,3 $\pm$ 1,4 ^b

* = I = somente L-metionina (mg);

II= L-metionina + L-triptofano + L-cistina (mg);

OV= metionina total (g/16gN) na ovalbumina;

**= resultados representam a média $\pm$ DP de três determinações. Valores assinalados com mesmas letras não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A recuperação do método para a determinação da metionina "total" em proteínas foi considerada satisfatória, com base nos resultados obtidos para a ovalbumina.

Os resultados do Quadro 9, mostram que a metionina, quando livre, sofreu danos maiores durante o processo. Sugerem que a menor recuperação verificada nas soluções de aminoácidos, quando comparada com a recuperação da metionina obtida para a ovalbumina, talvez seja consequência da exposição, mais prolongada, dos aminoácidos, quando livres, às condições drásticas da hidrólise alcalina. Nas proteínas, ao contrário, permaneceriam relativamente protegidos por mais tempo, até a degradação completa das mesmas.

Com efeito, comparando-se os Quadros 8 e 9, percebeu-se uma queda na recuperação de metionina quando as soluções foram

submetidas à hidrólise alcalina.

Os percentuais de recuperação da metionina das soluções não submetidas à hidrólise alcalina, foram nitidamente superiores e diferentes significativamente ($p < 0,01$), daqueles obtidos a partir das soluções hidrolisadas.

4.4.2 - Teores de metionina total e biodisponível *in vitro* na FCD e na FIA.

O Quadro 10 mostra os valores determinados *in vitro* de metionina total e biodisponível, bem como o percentual calculado de metionina biodisponível, nas farinhas crua descorticada e integral autoclavada do cultivar em estudo.

A FIA apresentou maiores teores de metionina total e biodisponível que a FCD. Observou-se também que o tratamento térmico aumentou a liberação enzimática do aminoácido, resultando no aumento do percentual de metionina biodisponível na farinha.

QUADRO 10 - Metionina total (MT), metionina biodisponível (MB) e percentual de metionina biodisponível (% MB) *in vitro* nas farinhas crua descorticada (FCD) e integral de feijão autoclavado (FIA)

PARAMETROS *	FCD	FIA
MT	$2,55 \pm 0,03^a$	$3,08 \pm 0,06^b$
MB	$1,12 \pm 0,02^a$	$1,56 \pm 0,02^b$
% MB	$43,9 \pm 0,8^a$	$50,5 \pm 0,7^b$

* = MT e MB expressos em g/16g N. Os resultados representam a média $\pm$ DP de tres determinações. Em uma mesma linha, valores assinalados com letras distintas, são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

4.5 - DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DAS FARINHAS CRUA DESCORTICADA E INTEGRAL DE FEIJÃO AUTOCLAVADO

O Quadro 11 apresenta os valores de digestibilidade protéica da FCD e da FIA determinados *in vitro* com base no sistema pepsina/pancreatina, como também a digestibilidade da caseína, determinada nas mesmas condições do estudo.

QUADRO 11 - Digestibilidade protéica *in vitro* (DX) da farinha crua descortificada (FCD) e integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado (FIA) e da caseína (CAS)

AMOSTRA	DX *
FCD	59,7 ± 1,7
FIA	76,3 ± 1,2
CAS	97,6 ± 2,2

* = cada ponto representa a média ± DP de três determinações. Todos os valores apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$)

Observou-se que o tratamento térmico resultou em aumento da digestibilidade das proteínas do feijão, e que o valor referente à caseína mostrou-se dentro do esperado.

A digestibilidade *in vitro* da farinha integral autoclavada não diferiu significativamente ($p < 0,01$) dos valores de digestibilidade, aparente ou verdadeira, determinados *in vivo* (Quadro 5).

4.6 - FRACIONAMENTO DA FARINHA CRUA DESCORTICADA

4.6.1 - *Balanço de massa e contribuição protéica das frações isoladas*

Para o estudo do balanço de massa da extração e contribuição protéica de cada fração, foram realizadas quantitativamente três extrações a partir de 20g de FCD, utilizando-se as mesmas soluções extratoras e sob condições ambientais idênticas.

A quantidade de farinha recuperada após o fracionamento, representada pela soma das quantidades obtidas de cada fração, foi de $18,36 \pm 0,73$, correspondendo a 91,8% das 20g extraídas.

Aproximadamente 54% do material não protéico permaneceu no resíduo fibroso insolúvel, que apresentou pequeno teor de proteínas insolúveis, compostas provavelmente pelas prolaminas presentes no feijão.

O Quadro 12 apresenta os valores médios relativos à quantidade obtida de cada fração, o conteúdo de proteínas (Nx6,25) e também os percentuais de proteínas de cada fração.

Observou-se que foram obtidas proporcionalmente maiores quantidades das frações G1 e GLU. As frações GLO e LIP forneceram quantidades semelhantes de proteínas.

Excetuando-se as proteínas remanescentes no resíduo fibroso insolúvel, provavelmente compostas em sua maioria por prolaminas, constatou-se que a fração ALB foi, dentre as frações estudadas, a que menos contribuiu para o total de proteínas extraídas do feijão.

As frações de globulinas foram obtidas com maior quantidade de proteínas que as demais. A fração de glutelinas continha apenas

48% de proteínas, provavelmente em consequência das características especiais de sua extração, capaz de solubilizar concomitantemente componentes lipossolúveis presentes na farinha.

QUADRO 12- Quantidade de proteína extraída (FRA), teor protéico (PRO%) e contribuição de cada uma das frações isoladas no fracionamento da farinha crua descorticada (FCD) do feijão "IAC-Carioca 80 SH"

FRACÇÕES	FRA (g)	% PRO (g%)	PRO (g)
GLU	2,77 ± 0,08 ^a	48,4 ± 1,5 ^a	1,33 ± 0,04 ^a
G1	2,76 ± 0,06 ^a	85,5 ± 1,8 ^b	2,16 ± 0,05 ^b
GLO	0,99 ± 0,04 ^b	86,6 ± 0,5 ^b	0,75 ± 0,03 ^c
ALB	0,86 ± 0,03 ^c	73,8 ± 0,7 ^c	0,57 ± 0,02 ^d
LIP	0,96 ± 0,04 ^b	79,2 ± 0,5 ^d	0,79 ± 0,03 ^c
FF	10,02 ± 0,45 ^d	1,5 ± 0,1 ^e	0,15 ± 0,01 ^e

* = valores referentes à média ± DP de três extrações, realizadas a partir de 20g de FCD; em uma mesma coluna, valores com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$);
 GLU= glutelinas; G1= globulina G1; GLO= globulinas;
 ALB= albuminas; LIP= lectinas/inibidores; FF= resíduo fibroso insolúvel.

A Figura 3 expressa, em termos percentuais, a contribuição de cada uma das frações protéicas isoladas em relação ao total de proteínas extraídas da FCD.

Seu exame revela que a Globulina G1 representa em torno de 37% das proteínas totais extraídas e, juntamente com as globulinas da fração GLO, correspondem a mais de 50% do total das proteínas do feijão. As glutelinas, são igualmente importantes, já que

constituem, aproximadamente, 1/4 das proteínas totais.

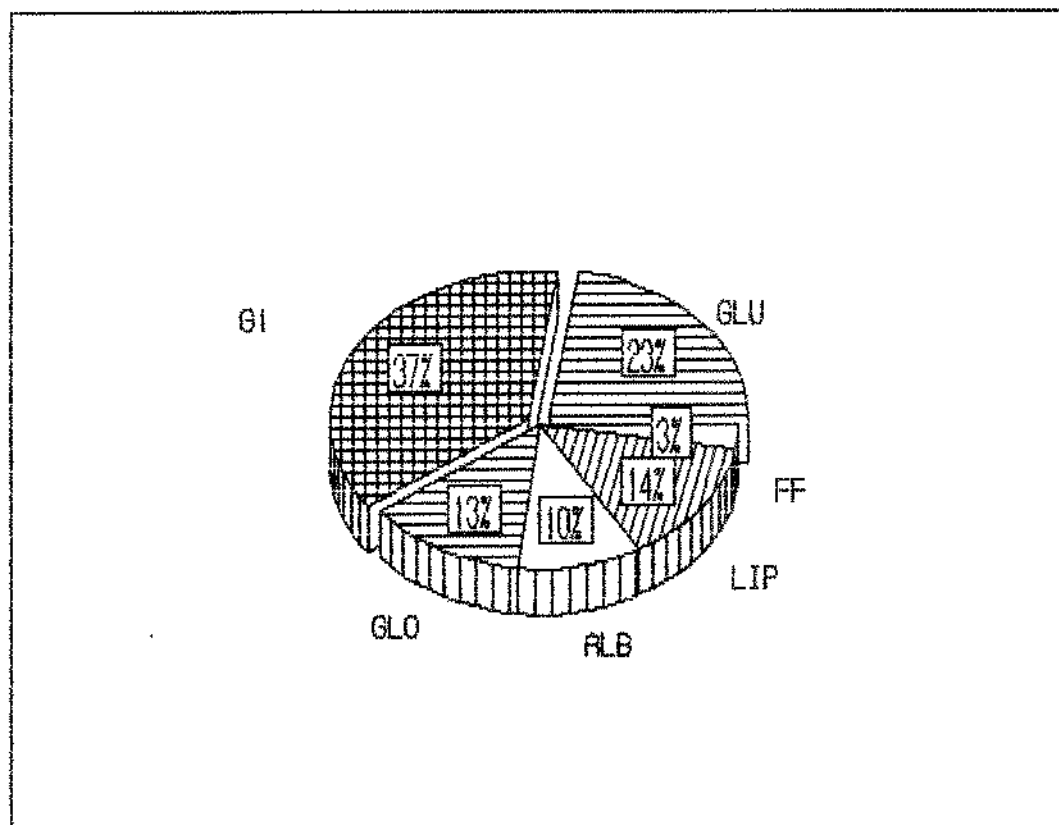


FIGURA 3 - Percentuais das proteínas totais extraídas do feijão "IAC-Carioca 80 SH", fornecidos por cada uma das frações isoladas.
 (glutelinas = GLU; globulinas = GLO; globulina G1 = G1; albuminas = ALB; lectinas/inibidores = LIP; resíduo fibroso insolúvel = FF).

Excetuando-se as prolaminas, confirmaram-se as suposições de que a fração ALB contribui percentualmente com menos proteínas que as demais.

Com base na constatação de que apenas 3% das proteínas totais permaneceu no resíduo fibroso insolúvel, dos quais a maior parte deve provavelmente ser constituída por prolaminas, considerou-se que o processo de extração foi adequado.

4.6.2- *Concentração de carboidrato total, atividade antitriptica e hemaglutinante das frações protéicas isoladas*

A curva-padrão empregada para a determinação dos carboidratos totais das frações, calculada por regressão linear, apresentou correlação de 0,9962.

As curvas de regressão utilizadas para quantificar a atividade do inibidor de tripsina nas frações globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores apresentaram correlações negativas (-0,9773, -0,9683, -0,9633 e -0,9987, respectivamente). Os valores relativos aos interceptos, obtidos pelo prolongamento da curva de regressão até o eixo Y (0,0mL de extrato), foram 16,64 (GLO), 29,1 (G1), 78,67 (ALB) e 997,3 (LIP).

Os resultados obtidos para as diferentes frações são apresentados no Quadro 13.

Os teores de carboidratos nas frações GLO, GLU e ALB não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). A fração LIP apresentou maior teor de carboidratos que as demais frações. A fração ALB, apresentou valores superiores aos das globulinas e, ao contrário das demais, não se observou qualquer atividade antitriptica e hemaglutinante na fração de glutelinas.

QUADRO 13- Carboidratos totais (CT), atividade do inibidor de tripsina (TIA) e hemaglutinante total (AHT), das frações de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores (LIP), isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH"

FRAÇÕES	CT *	TIA **	AHT ***
GLU	6,4 ± 0,4 ^a	0	0
GLO	5,9 ± 0,2 ^a	49	185
G 1	7,5 ± 0,5 ^a	82	374
ALB	7,8 ± 0,2 ^a	267	434
LIP	11,2 ± 0,1 ^b	3140	3232

* = valores expressos em g% de manose e representam a média ± DP de tres determinações. Em uma mesma coluna, valores com letras diferentes apresentam diferença significativa (p < 0,05);

** = unidades de tripsina inibida/ mg proteína;

*** = título hemaglutinante/ mg proteína.

As proteínas da fração LIP, confirmando as expectativas, apresentaram também atividade antitriptica e hemaglutinante, significativamente maior que as outras proteínas extraídas. Os valores de atividade antitriptica e hemaglutinante determinados na fração G1, não eram esperados, e podem indicar a ocorrência de sua contaminação por resíduos da fração LIP, durante o fracionamento.

A Figura 4 representa os percentuais de atividade antitriptica e hemaglutinante das frações, calculados com base no total obtido pela soma dos valores apresentados por cada uma delas.

Observou-se que a fração de lectinas e inibidores de proteases concentrou praticamente toda a atividade antitriptica e hemaglutinante da farinha, respectivamente 89 e 77% do total. Em relação à atividade antitriptica, constatou-se que as frações de globulinas (GLO e G1) são praticamente isentas, ao passo que a fração albumina apresenta um valor intermediário.

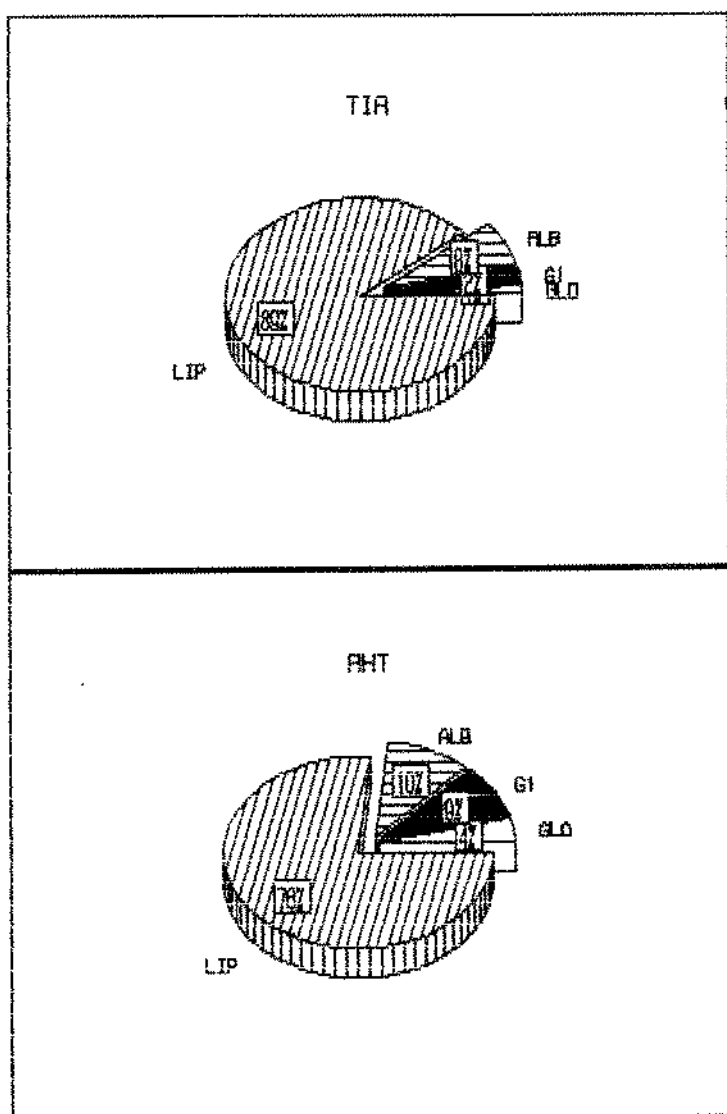


FIGURA 4 - Percentuais de atividade antitriptica (TIA) e he-
maglutinante (AHT) das frações protéicas isoladas
expressos em relação ao total resultante da soma
dos valores de todas as frações.
GLO= globulinas; G1= globulina G1; ALB= albuminas;
LIP= lectinas/inibidores de proteases)

Quando consideradas em conjunto, as proteínas contidas nas frações de albuminas e LIP concentraram 97% de toda a atividade antitriptica. O teor relativamente elevado de atividade hemaglutinante determinado na fração G1, foi atribuído à ocorrência provável de contaminação pelas proteínas da fração LIP quando da precipitação e separação da globulina G1 do sobrenadante I (Figura 1).

As frações ALB e GLO se equiparam em termos de qualidade de suas proteínas, cuja utilização, por sua vez, foi semelhante à da farinha integral de feijão autoclavado ($p < 0,05$).

4.7 - COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA DAS FRAÇÕES PROTEICAS CRUAS E AUTOCLAVADAS

O Quadro 14 apresenta a composição aminoacídica das frações cruas isoladas a partir da farinha descorticada do feijão "IAC-Carioca 80 SH".

Os valores de metionina correspondem à metionina total, determinada após hidrólise alcalina. A cisteína foi determinada como ácido cistéico, após oxidação por ácido perfórmico, seguida de hidrólise ácida.

Observou-se que a principal proteína do feijão, a Globulina G1, é dentre todas a mais deficiente em aminoácidos sulfurados e triptofano. As globulinas isoladas na fração GLO, ainda que apresentem composição aminoacídica semelhante à G1, mostram-se menos deficientes que ela em relação a esses aminoácidos essenciais. Ao contrário, as glutelinas (GLU) e as albuminas (ALB), apresentaram composição aminoacídica de maior qualidade.

QUADRO 14 - Composição aminoacídica das frações cruas de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores (LIP) isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH"

AA *	GLU	GLO	G1	ALB	LIP
ASP	9,97 ± 0,74 ^a	15,54 ± 0,23 ^b	15,64 ± 0,37 ^b	15,38 ± 0,43 ^b	17,39 ± 0,48 ^c
THR	4,43 ± 0,28 ^a	3,84 ± 0,11 ^b	3,79 ± 0,17 ^b	4,38 ± 0,18 ^a	8,20 ± 0,11 ^c
SER	5,42 ± 0,24 ^a	7,40 ± 0,27 ^b	7,78 ± 0,31 ^b	7,29 ± 0,31 ^b	9,90 ± 0,13 ^c
GLU	16,47 ± 0,88 ^a	25,05 ± 0,44 ^b	23,83 ± 1,00 ^b	24,66 ± 0,71 ^b	15,80 ± 0,90 ^a
PRO	18,41 ± 2,74 ^a	5,54 ± 0,18 ^b	5,34 ± 0,27 ^b	6,44 ± 0,28 ^c	5,92 ± 0,11 ^c
GLY	4,70 ± 0,13 ^a	4,92 ± 0,10 ^a	5,12 ± 0,11 ^a	5,07 ± 0,10 ^a	6,54 ± 0,32 ^b
ALA	6,11 ± 0,27 ^a	4,82 ± 0,06 ^b	4,85 ± 0,08 ^b	5,19 ± 0,06 ^c	6,99 ± 0,25 ^a
CYS	0,15 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,01 ^b	2,38 ± 0,10 ^c	0,33 ± 0,02 ^d
VAL	5,89 ± 0,42 ^a	5,50 ± 0,08 ^a	5,83 ± 0,09 ^a	5,64 ± 0,11 ^a	7,28 ± 0,36 ^b
MET	2,40 ± 0,02 ^a	1,38 ± 0,02 ^b	1,16 ± 0,02 ^c	1,66 ± 0,05 ^d	1,90 ± 0,06 ^e
ILE	4,97 ± 0,16 ^a	5,41 ± 0,12 ^a	5,54 ± 0,11 ^a	5,11 ± 0,15 ^a	5,86 ± 0,36 ^a
LEU	9,25 ± 0,29 ^a	11,13 ± 0,22 ^b	11,31 ± 0,35 ^b	10,36 ± 0,26 ^{ab}	10,60 ± 0,22 ^b
TYR	3,99 ± 0,26 ^a	4,20 ± 0,17 ^a	4,06 ± 0,12 ^a	3,81 ± 0,17 ^a	4,20 ± 0,16 ^a
PHE	6,24 ± 0,10 ^a	7,96 ± 0,10 ^b	7,96 ± 0,18 ^b	7,06 ± 0,23 ^c	7,83 ± 0,29 ^{bc}
LYS	9,22 ± 0,40 ^a	6,33 ± 0,18 ^b	6,33 ± 0,12 ^b	6,91 ± 0,18 ^c	5,23 ± 0,15 ^d
HIS	3,28 ± 0,09 ^a	3,18 ± 0,07 ^a	3,43 ± 0,16 ^a	3,41 ± 0,11 ^a	2,30 ± 0,12 ^b
ARG	4,85 ± 0,10 ^a	5,81 ± 0,16 ^b	5,78 ± 0,25 ^b	5,44 ± 0,12 ^b	5,66 ± 0,10 ^b
TRP	1,42 ± 0,08 ^a	0,95 ± 0,08 ^b	0,22 ± 0,01 ^c	2,62 ± 0,10 ^d	0,41 ± 0,03 ^e

* = resultados expressos em g/100 N e cada valor representa a média ± DP de três determinações. Em uma mesma linha, valores com letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A fração GLU, é dentre todas as frações, a que possui mais lisina e metionina; seu teor em triptofano é elevado. No entanto, tem menor teor de fenilalanina que as demais frações.

As proteínas contidas na fração ALB são particularmente ricas em triptofano e cisteína. Apresentaram, em geral, uma composição mais equilibrada que as proteínas presentes nas outras frações isoladas. A fração LIP tem um teor elevado de treonina e embora contenha muita metionina possui, proporcionalmente, menos cisteína. Mostrou-se também relativamente pobre em lisina, triptofano e histidina, quando comparada com as demais frações.

O Quadro 15 apresenta a composição aminoacídica das frações autoclavadas. Os valores de metionina foram determinados após hidrólise alcalina e os de cisteína, após oxidação pelo ácido perfórmico.

QUADRO 15 - Composição aminoacídica das frações de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores (LIP), isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH", autoclavadas.

AA ‡	GLU	GLO	G 1	ALB	LIP
ASP	10,08 ± 0,45 ^a	16,16 ± 0,42 ^b	15,70 ± 0,30 ^b	15,82 ± 0,21 ^b	18,69 ± 0,26 ^c
THR	4,44 ± 0,13 ^a	3,70 ± 0,17 ^b	3,68 ± 0,12 ^b	4,28 ± 0,20 ^a	8,15 ± 0,16 ^c
SER	5,10 ± 0,20 ^a	6,99 ± 0,23 ^b	7,39 ± 0,24 ^b	6,85 ± 0,20 ^b	9,82 ± 0,21 ^c
GLU	17,47 ± 0,52 ^a	26,05 ± 0,37 ^b	25,94 ± 0,51 ^b	25,49 ± 0,36 ^b	16,49 ± 0,17 ^a
PRO	17,38 ± 1,04 ^a	4,81 ± 0,13 ^b	4,68 ± 0,19 ^b	4,61 ± 0,13 ^b	5,13 ± 0,11 ^c
GLY	4,89 ± 0,18 ^a	4,89 ± 0,12 ^a	5,20 ± 0,06 ^a	5,15 ± 0,10 ^a	6,59 ± 0,12 ^b
ALA	5,78 ± 0,24 ^a	5,00 ± 0,10 ^b	5,17 ± 0,16 ^b	5,29 ± 0,18 ^b	7,06 ± 0,21 ^c
CYS	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,96 ± 0,08 ^b	0,00 ± 0,00 ^a
VAL	6,15 ± 0,19 ^a	5,63 ± 0,17 ^a	5,70 ± 0,18 ^a	5,77 ± 0,17 ^a	7,46 ± 0,20 ^b
MET	2,21 ± 0,12 ^a	1,16 ± 0,01 ^b	1,02 ± 0,01 ^c	1,19 ± 0,11 ^{bc}	0,98 ± 0,07 ^c
ILE	4,45 ± 0,18 ^a	5,24 ± 0,10 ^b	5,34 ± 0,10 ^b	4,58 ± 0,11 ^a	5,50 ± 0,16 ^b
LEU	8,09 ± 0,20 ^a	10,31 ± 0,18 ^b	11,07 ± 0,21 ^b	8,99 ± 0,20 ^c	9,91 ± 0,18 ^b
TYR	4,20 ± 0,26 ^a	4,18 ± 0,12 ^a	4,32 ± 0,12 ^a	4,01 ± 0,16 ^a	4,37 ± 0,18 ^a
PHE	6,62 ± 0,19 ^a	8,29 ± 0,16 ^b	8,42 ± 0,16 ^b	7,45 ± 0,12 ^c	8,22 ± 0,14 ^b
LYS	8,69 ± 0,22 ^a	5,85 ± 0,12 ^b	5,12 ± 0,13 ^c	7,30 ± 0,39 ^d	4,79 ± 0,13 ^c
HIS	3,62 ± 0,09 ^a	3,48 ± 0,05 ^a	3,43 ± 0,08 ^a	3,44 ± 0,08 ^a	2,42 ± 0,07 ^b
ARG	5,10 ± 0,16 ^a	6,10 ± 0,12 ^b	6,00 ± 0,15 ^b	5,66 ± 0,10 ^b	4,06 ± 0,14 ^c
TRP	1,42 ± 0,07 ^a	0,90 ± 0,06 ^b	0,20 ± 0,01 ^c	2,70 ± 0,10 ^d	0,35 ± 0,06 ^e

‡ = resultados expressos em g AA/ 16g N. Cada ponto representa a média ± DP de três determinações; em uma mesma linha, valores com letras iguais não apresentam diferença significativa (p<0,05).

Ainda que a maioria dos teores de aminoácidos das frações cruas e autoclavadas não tenham apresentado diferenças significativas (p<0,05), observou-se que os teores de alguns aminoácidos foram menores nas frações autoclavadas, e que fração LIP foi, proporcionalmente a mais afetada.

Correlacionando-se os teores de aminoácidos de cada uma das frações cruas com seus correspondentes nas frações autoclavadas (Quadros 14 e 15, respectivamente), observa-se que a cisteína, a metionina e a lisina tiveram seus teores reduzidos significativamente ($p < 0,05$) após o tratamento térmico. A prolina foi afetada pela autoclavagem das frações GLO, ALB e LIP.

Os aminoácidos cisteína, metionina, leucina, prolina e histidina tiveram seus teores significativamente reduzidos após a autoclavagem da fração GLO ($p < 0,05$).

O teor de metionina na fração LIP foi drasticamente reduzido pelo tratamento térmico; conseqüentemente, seu conteúdo de metionina igualou-se ao da fração de globulina G1 ($p < 0,05$), onde aparentemente o dano a este aminoácido resultante do tratamento térmico foi menor.

4.8 - DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DAS FRAÇÕES PROTEICAS CRUAS E AUTOCLAVADAS

O Quadro 16 apresenta os valores de digestibilidade obtidos a partir da proteólise pelo sistema pepsina-pancreatina das frações cruas e autoclavadas.

Observou-se um aumento na digestibilidade de todas as frações em função do tratamento térmico. As frações GLU e ALB foram as que apresentaram maior aumento em consequência do tratamento térmico, igualando-se à Globulina G1, principal proteína do feijão.

A fração ALB, quando crua, possui a menor digestibilidade dentre todas as frações; no entanto, após autoclavagem, a fração LIP tornou-se a fração mais resistente à ação das proteases.

QUADRO 16 - Digestibilidade *in vitro* das frações de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/ inibidores de proteases (LIP), cruas e autoclavadas, isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH"

AMOSTRAS *	CRUAS	AUTOCLAVADAS
GLU	65,3 ± 0,7 ^a	92,9 ± 4,4 ^{ab}
GLO	77,4 ± 4,0 ^b	93,5 ± 1,0 ^a
G 1	77,3 ± 0,7 ^b	87,8 ± 4,5 ^{ab}
ALB	56,1 ± 0,8 ^c	86,8 ± 2,0 ^b
LIP	61,3 ± 3,1 ^a	74,9 ± 3,1 ^c

* = os resultados são expressos em percentual de digestibilidade e representam a média ± DP de três determinações. Em uma mesma coluna, valores com letras iguais não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Em uma mesma linha, todos os valores diferiram significativamente ($p < 0,05$).

4.9 - METIONINA POTENCIALMENTE BIODISPONIVEL NAS FRAÇÕES PROTEICAS CRUAS E AUTOCLAVADAS

O Quadro 17 mostra os valores determinados de metionina potencialmente biodisponível nas frações cruas e autoclavadas.

A fração glutelinas, crua ou autoclavada, apresentou o maior teor de metionina biodisponível dentre as frações isoladas.

As frações GLO e ALB autoclavadas mostraram conter teores semelhantes, enquanto a globulina G1, principal proteína do feijão, apresentou baixos teores de metionina biodisponível, tanto crua como após tratamento térmico.

Os teores de metionina disponível liberados pelas frações autoclavadas foram maiores que pelas frações cruas, exceto em relação à fração lectinas e inibidores de proteases e, em menor extensão, às glutelinas.

QUADRO 17 - Metionina potencialmente biodisponível nas frações de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores de proteases (LIP), cruas e autoclavadas, isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH"

AMOSTRAS	CRUAS	AUTOCLAVADAS
GLU	1,30 ± 0,03 ^a	1,22 ± 0,02 ^a
GLO	0,64 ± 0,04 ^b	0,90 ± 0,01 ^b
G1	0,55 ± 0,01 ^c	0,71 ± 0,02 ^c
ALB	0,41 ± 0,02 ^d	0,85 ± 0,03 ^b
LIP	0,64 ± 0,02 ^b	0,56 ± 0,01 ^d

* = os resultados são expressos em g/16g N e representam a média ± DP de três determinações. Em uma coluna, valores com letras iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$).

No entanto, quando os resultados foram interpretados em termos percentuais, constatou-se que, com exceção da fração glutelinas, o tratamento térmico resultou em aumento na liberação de metionina pelas proteases em relação à fração crua.

A Figura 5 representa a variação dos teores de metionina potencialmente biodisponível de cada fração (Quadro 17), expressos percentualmente em relação a seus valores de metionina total (Quadros 14 e 15), em função do tratamento térmico.

O aumento do percentual de metionina potencialmente biodisponível contido em cada fração resultante da autoclavagem das frações ALB, LIP, GLO e G1, foi de 189, 69, 67 e 47 %, respectivamente.

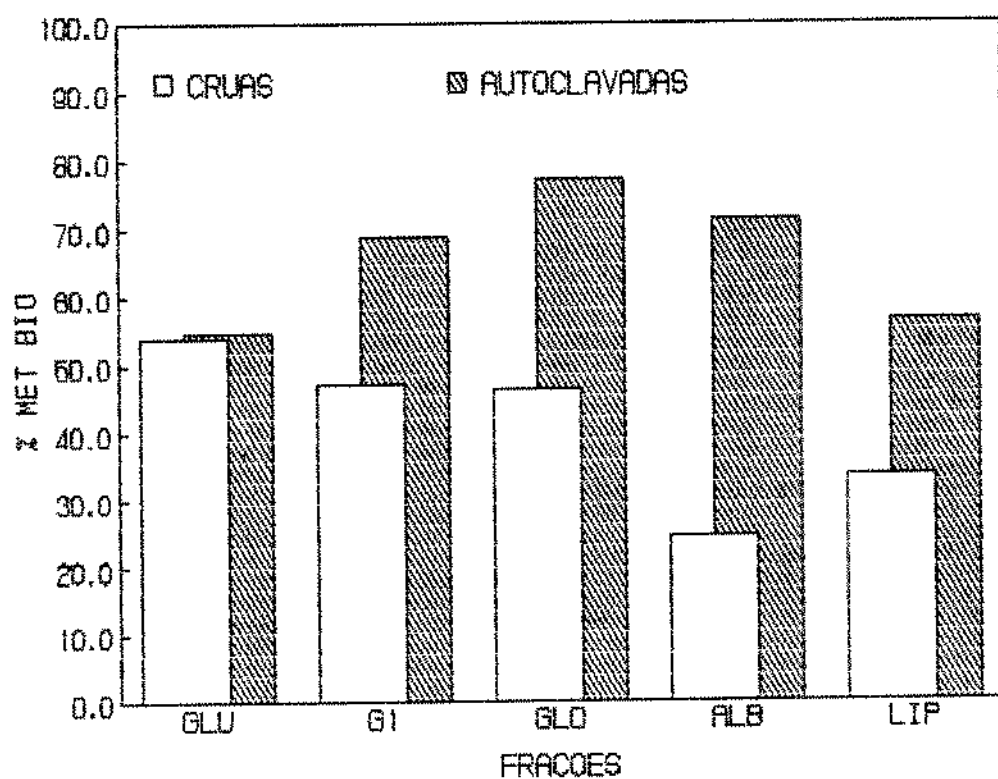


FIGURA 5 - Variação do percentual de liberação de metionina (% Met Bio) pela proteólise *in vitro* pelo sistema pepsina/pancreatina em função do tratamento térmico (GLU= glutelinas; GLO= globulinas; G1=globulina G1; ALB= albuminas; LIP= lectinas/inibidores).

Com relação às glutelinas, constatou-se os percentuais de metionina potencialmente biodisponível contidos na fração foram os mesmos, antes e após autoclavagem ($p < 0,05$).

Com base na composição percentual das frações em relação ao total de proteínas extraídas da FCD (Figura 3) e dos teores de metionina liberados pela proteólise *in vitro* das frações autoclavadas (Quadro 17), foi possível estimar a contribuição individual de metionina biodisponível de cada uma delas.

Os resultados, expressos percentualmente em relação à soma da metionina liberada enzimaticamente de todas as frações autoclavadas, excluindo a fração fibrosa insolúvel, são apresentados na Figura 6.

Constatou-se que as glutelinas foram as proteínas que mais contribuíram com metionina potencialmente biodisponível, ainda que a autoclavagem não tenha resultado em qualquer aumento na liberação do aminoácido. A Globulina G1, apesar de representar 37% das proteínas totais, contribuiu com uma quantidade de metionina ligeiramente inferior às proteínas alcali-solúveis do feijão.

As frações ALB e LIP foram as que apresentaram menor contribuição do aminoácido.

4.10- GRAU DE HIDROLISE E LIBERAÇÃO DE METIONINA DAS FRAÇÕES PROTEICAS CRUAS E AUTOCLAVADAS

A quantificação dos grupamentos alfa-aminicos liberados durante a proteólise para o acompanhamento do grau de hidrólise foi realizada a partir da equação de correlação linear entre concentrações crescentes de leucina e suas respectivas extinções a 340nm, após reação com o TNBS ($r = 0,9939$).

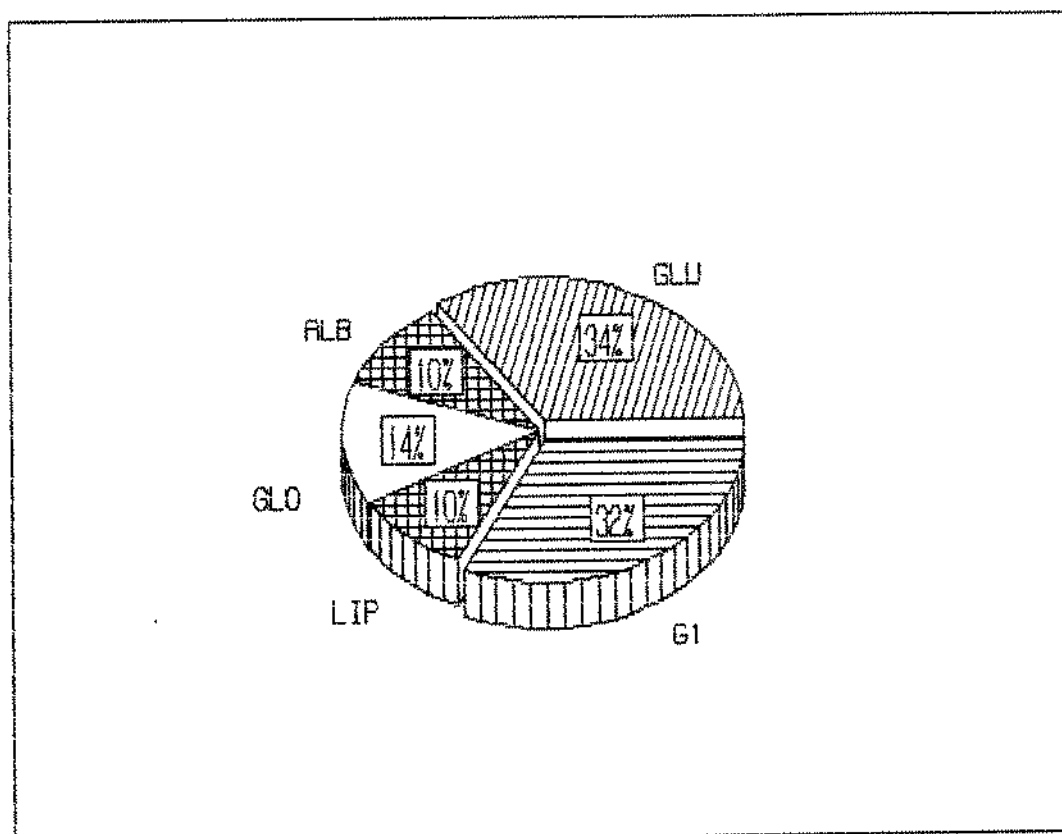


FIGURA 6- Contribuição percentual de metionina das frações isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH", expressa em relação à soma dos teores de metionina biodisponível de cada fração autoclavada.
 (GLU= glutelinas; G1= globulina G1; GLO= globulinas; ALB= albuminas; LIP= lectinas/inibidores)

O Quadro 18 mostra a liberação de aminoácidos, expressos como leucina, no transcurso da digestão *in vitro* das diversas frações protéicas cruas.

QUADRO 18 - Leucina liberada *in vitro* (mM/g de proteína) ao longo da hidrólise enzimática das frações cruas de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores (LIP) do feijão "IAC-Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina (PEP/PAN)

TEMPO (min.)	GLU	GLO	G1	ALB	LIP
PEP					
60	1,33	0,56	0,96	0,83	1,42
90	1,50	0,88	1,17	1,35	1,71
120	1,76	1,03	1,42	1,64	1,91
150	1,92	1,15	1,52	1,74	2,08
180	1,98	1,26	1,96	1,83	2,42
PAN					
210	2,67	2,20	3,20	2,59	3,22
225	3,52	2,87	4,00	3,02	3,75
240	4,29	3,81	4,60	3,28	4,42
270	5,13	5,22	5,39	3,79	4,75
300	5,44	6,02	5,85	4,42	4,96
360	5,67	6,22	6,45	4,80	5,11

Os valores correspondentes ao total de milimoles de aminoácidos por grama de proteína (*h tot*) de cada fração estudada, empregados para o acompanhamento do grau de hidrólise segundo ADLER-NISSEN (1), foram de 9,20, 9,14, 9,10, 9,35 e 9,66 para as frações de glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores, respectivamente.

O Quadro 19 mostra a liberação de aminoácidos, expressos como leucina, no transcurso da digestão *in vitro* das diversas frações protéicas autoclavadas.

QUADRO 19 - Leucina liberada *in vitro* (mM/g de proteína) ao longo da hidrólise enzimática das frações autoclavadas de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores (LIP) do feijão "IAC-Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina (PEP/PAN)

TEMPO (min.)	GLU	GLO	G1	ALB	LIP
PEP					
60	1,30	0,82	1,15	1,37	1,36
90	1,78	1,17	1,58	2,45	1,68
120	1,91	1,40	2,01	2,59	1,87
150	2,00	1,70	2,28	2,68	2,24
180	2,03	2,08	2,48	2,73	2,38
PAN					
210	4,52	4,15	4,18	4,51	4,35
225	5,66	4,87	5,05	5,35	4,57
240	6,44	6,13	5,68	6,04	5,00
270	7,14	6,86	6,37	6,60	5,73
300	7,57	7,58	6,83	6,88	6,09
360	7,78	7,85	7,40	7,15	6,38

Os valores correspondentes ao total de milimoles de aminoácidos por grama de proteína (*h tot*) de cada fração autoclavada estudada, empregados para o acompanhamento do grau de hidrólise segundo ADLER-NISSEN (1), foram de 9,14, 9,08, 9,11, 9,19 e 9,60 para as frações glutelinas, globulinas, globulina G1, albuminas e lectinas/inibidores, respectivamente.

Constatou-se que, em geral, o tratamento térmico aumentou a liberação de aminoácidos de todas frações e que as frações autoclavadas de globulinas, glutelinas e globulina G1 liberaram mais aminoácidos por g de proteína que as outras, de acordo com sua digestibilidade.

No entanto, parece que a autoclavagem dificultou a digestão, pela pepsina, das glutelinas e das lectinas e inibidores de enzimas digestivas.

Ao contrário das demais frações, não se constatou um aumento expressivo no total de milimoles de aminoácidos liberados das frações tratadas termicamente, ao fim dos 180 min de proteólise pela pepsina.

A fração LIP mostrou-se a mais resistente à ação enzimática da pancreatina que as demais frações, podendo-se notar um retardamento na liberação de aminoácidos em relação às outras frações, particularmente quando autoclavada.

Os Quadros 20 e 21 mostram, respectivamente, os teores em gramas de metionina liberada por 100g de proteína no transcurso da digestão *in vitro* das diversas frações protéicas cruas e autoclavadas. A quantificação da metionina liberada durante a proteólise foi feita com base na mesma equação de correlação linear descrita no item 4.4.

Observou-se que o tratamento térmico aumentou significativamente a liberação de metionina das frações globulinas, globulina G1 e albuminas.

A fração GLU, crua ou autoclavada, comparativamente foi a fração que liberou maior quantidade de metionina por 16g de nitrogênio, ao final das 6 horas de digestão enzimática *in vitro*.

As frações G1 e LIP, ao contrário, contribuíram com menos metionina que as demais, mesmo quando autoclavadas. Quando cruas, observou-se que a globulina G1 liberou menos metionina que a fração LIP.

As proteínas da fração LIP liberaram menos metionina quando foram tratadas termicamente, em termos absolutos. A liberação de metionina sob ação da pepsina, foi significativamente menor na fração autoclavada.

QUADRO 20 - Metionina liberada (g/16gN) durante a digestão *in vitro* das frações cruas de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores de proteases (LIP) do feijão "IAC-Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina (PEP/PAN)

TEMPO (min)	GLU	GLO	G1	ALB	LIP
PEP					
60	0,17	0,10	0,09	0,10	0,04
90	0,19	0,14	0,13	0,14	0,08
120	0,21	0,22	0,17	0,22	0,12
150	0,24	0,24	0,23	0,24	0,17
180	0,31	0,25	0,25	0,25	0,18
PAN					
210	0,41	0,32	0,28	0,32	0,27
225	0,52	0,38	0,30	0,38	0,38
240	0,88	0,49	0,33	0,49	0,43
270	1,00	0,55	0,38	0,55	0,48
300	1,03	0,57	0,43	0,57	0,53
360	1,16	0,58	0,49	0,58	0,56

QUADRO 21 - Metionina liberada (g/16gN) durante a digestão *in vitro* das frações autoclavadas de glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores de proteases (LIP) do feijão "IAC-Carioca 80 SH", pelo sistema pepsina/pancreatina (PEP/PAN)

TEMPO (min)	GLU	GLO	G1	ALB	LIP
PEP					
60	0,08	0,14	0,11	0,14	0,02
90	0,12	0,28	0,20	0,28	0,05
120	0,14	0,33	0,24	0,33	0,07
150	0,16	0,35	0,28	0,35	0,08
180	0,18	0,37	0,32	0,37	0,09
PAN					
210	0,43	0,67	0,49	0,67	0,13
225	0,54	0,72	0,56	0,72	0,21
240	0,78	0,78	0,61	0,78	0,32
270	1,00	0,81	0,64	0,81	0,40
300	1,09	0,83	0,66	0,83	0,45
360	1,17	0,85	0,68	0,85	0,49

Os resultados sugerem que tratamento térmico parece ter retardado a liberação do aminoácido da fração de glutelinas, ao longo do tempo de hidrólise.

No entanto, observou-se que o total de metionina liberado ao final das seis horas de hidrólise das glutelinas autoclavadas foi praticamente o mesmo da fração crua.

O Quadro 22 mostra os índices de correlação observados entre o grau de hidrólise das frações protéicas cruas e autoclavadas e a liberação de metionina não-oxidada por unidade de tempo, calculados com base nos dados apresentados nos Quadros 18, 19, 20 e 21.

QUADRO 22 - Índices de correlação (r) entre a liberação de metionina e o grau de hidrólise por unidade de tempo das frações glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores de proteases (LIP), do feijão "IAC-Carioca 80 SH", cruas e autoclavadas.

FRAÇÕES	CRUAS	AUTOCLAVADAS
GLU	0,9914	0,9796
GLO	0,9721	0,9706
G 1	0,9634	0,9854
ALB	0,9815	0,9858
LIP	0,9958	0,9528

Os estudos de correlação sugerem que o tratamento térmico induziu a ocorrência de algum tipo de alteração na liberação de metionina da fração LIP pelas proteases: verificou-se uma redução

expressiva na correlação entre o grau de hidrólise e a liberação do aminoácido desta fração após a autoclavagem. No entanto, constatou-se que a correlação entre a liberação de metionina e o grau de hidrólise foi sempre significativa ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados nas Figuras 7 a 11 representam o grau de hidrólise e a liberação de metionina, expressa percentualmente em relação ao conteúdo de metionina "total" de cada fração, crua e autoclavada, ao longo da hidrólise enzimática.

Com exceção das glutelinas, observou-se que, em geral, a liberação de metionina das proteínas das frações acompanhou o curso da hidrólise.

As Figuras 7, 8 e 9 revelam que o tratamento térmico melhorou tanto a digestibilidade, como a liberação de metionina das frações GLO, G1 e ALB.

O tratamento térmico não aumentou a ação da pepsina sobre as proteínas da fração LIP (Figura 10) e, da mesma forma, não se constatou um aumento expressivo na liberação de metionina sob ação desta enzima em função da autoclavagem. Entretanto, facilitou a ação da pancreatina e, conseqüentemente, da liberação de metionina da fração de lectinas e inibidores.

A Figura 11 mostra que o tratamento térmico da fração GLU, apesar de não resultar em aumento da ação da pepsina, induziu um aumento significativo na digestibilidade de suas proteínas pela pancreatina. Constatou-se que, ao contrário, a liberação de metionina da fração autoclavada pouco diferiu da fração crua.

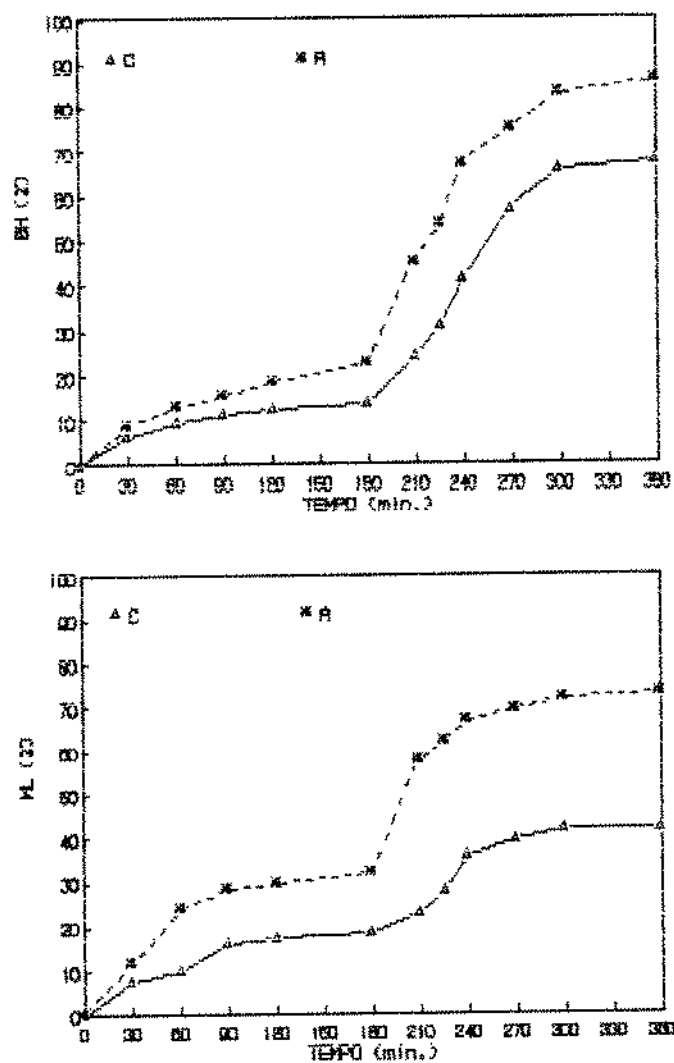


FIGURA 7 - Grau de hidrólise (GH) e percentual de liberação de metionina (ML), expresso em relação ao conteúdo de metionina total da fração globulinas, crua (C) e autoclavada (A), pela ação da pepsina (3h) seguida da pancreatina (3h).

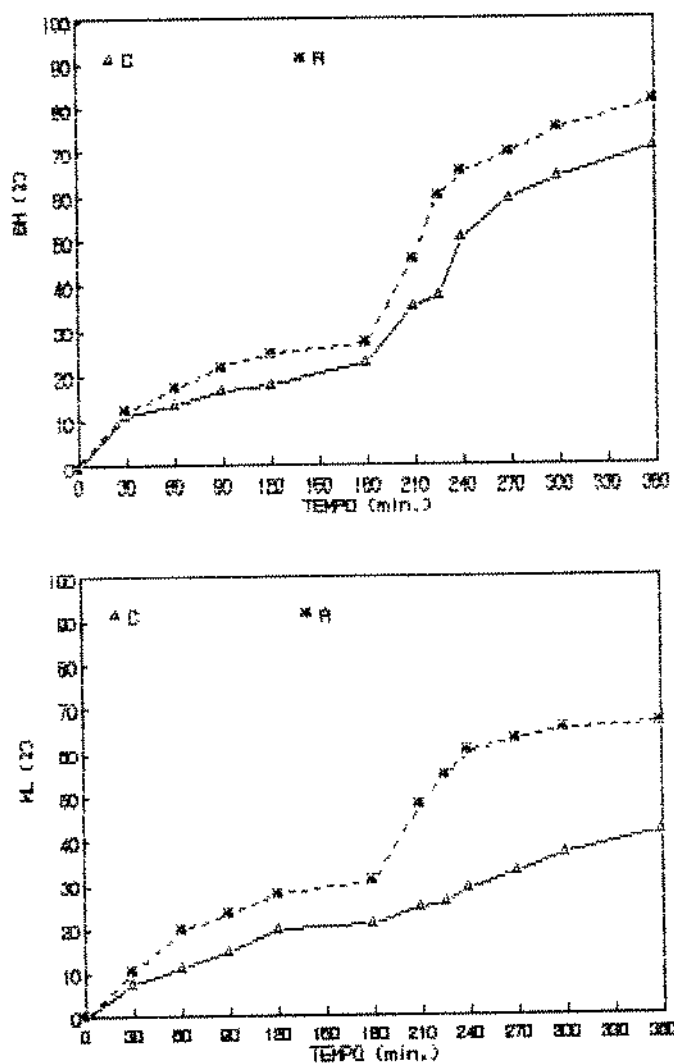


FIGURA 8 - Grau de hidrólise (GH) e percentual de liberação de metionina (ML), expresso em relação ao conteúdo de metionina total da fração globulina G1, crua (C) e autoclavada (A), pela ação da pepsina (3h) e seguida da pancreatina (3h).

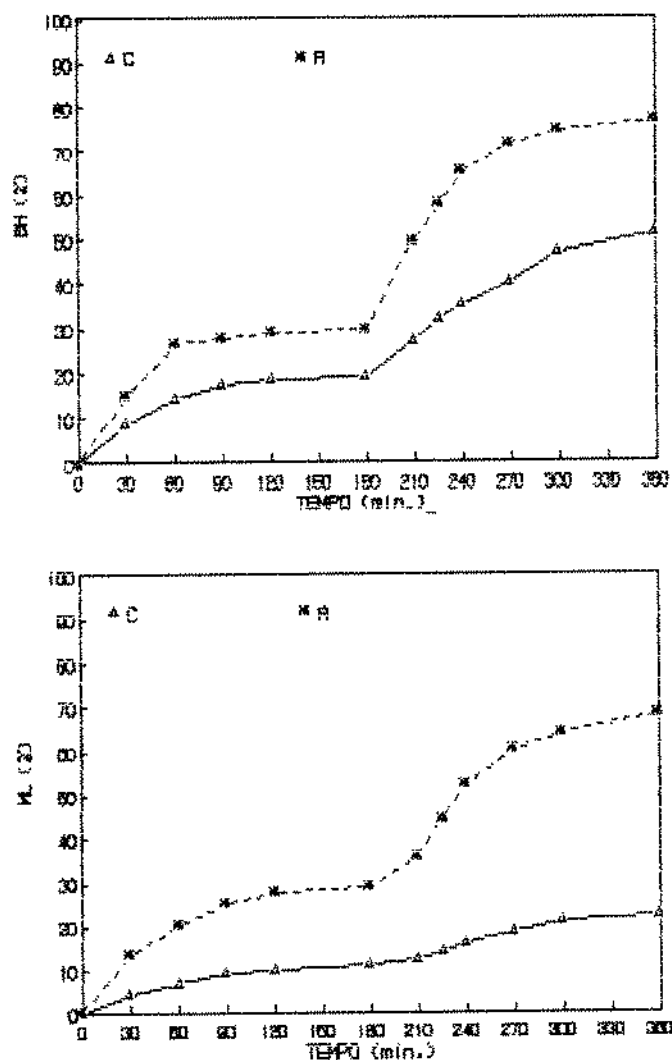


FIGURA 9 - Grau de hidrólise (GH) e percentual de liberação de metionina (ML), expresso em relação ao conteúdo de metionina total da fração albuminas, crua (C) e autoclavada (A), pela ação da pepsina (3h) seguida da pancreatina (3h).

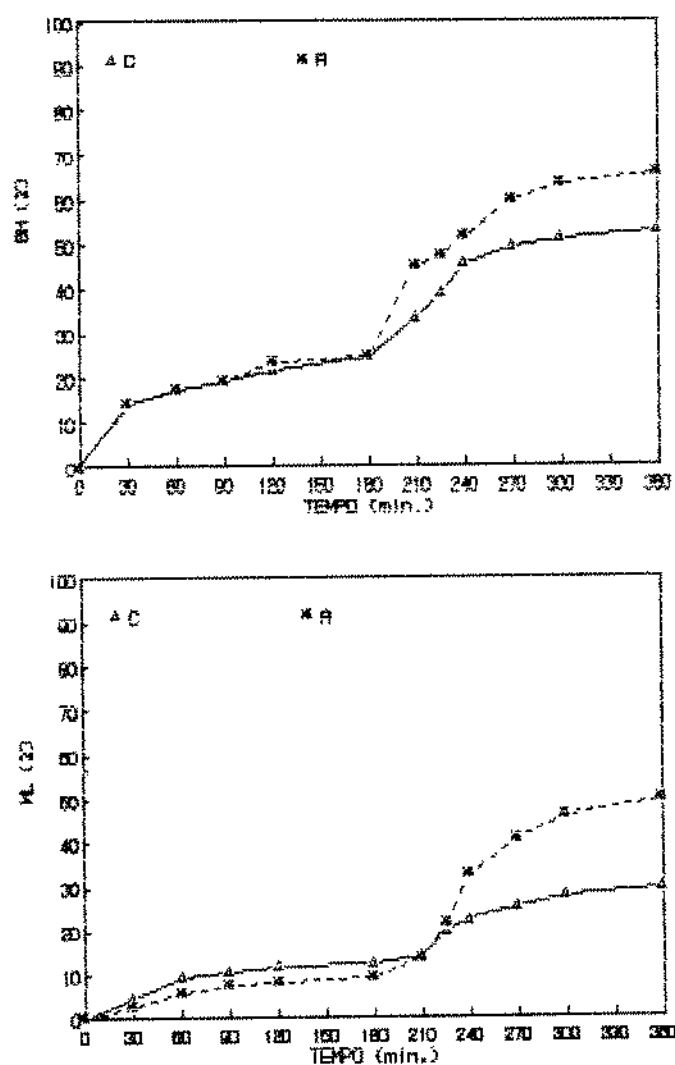


FIGURA 10- Grau de hidrólise (GH) e percentual de liberação de metionina (ML), expresso em relação ao conteúdo de metionina total da fração lectinas /inibidores de enzimas digestivas, crua (C) e autoclavada (A), pela ação da pepsina (3h) seguida da pancreatina (3h).

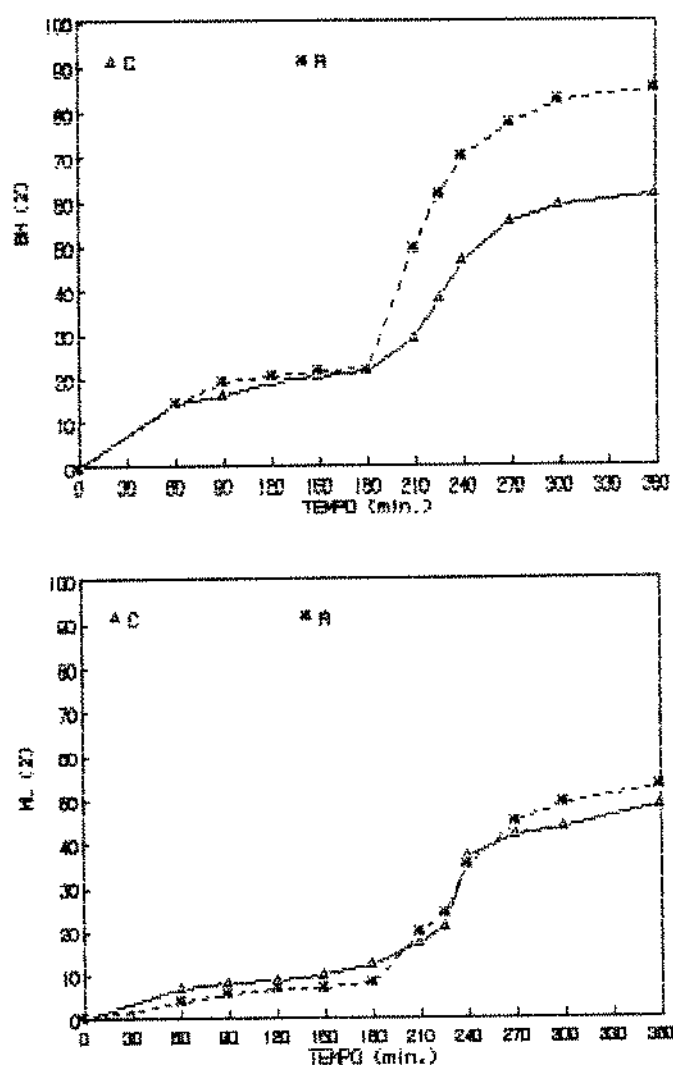


FIGURA 11- Grau de hidrólise (GH) e percentual de liberação de metionina (ML), expresso em relação ao conteúdo de metionina total da fração glutelinas, crua (C) e autoclavada (A), pela ação da pepsina (3h) seguida da pancreatina (3h).

4.11= ÍNDICES RELATIVOS A AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA QUALIDADE PROTEICA DAS FRAÇÕES

4.11.1 = " Valor biológico calculado " (VB-C)

Com o objetivo de avaliar se o valor biológico determinado *in vitro* (VB-C) apresentou correlação significativa com o valor biológico determinado *in vivo*, calculou-se o VB-C para a farinha integral de feijão autoclavado, obtendo-se o valor de $83,9 \pm 2,2$. Este valor não apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) do valor determinado *in vivo* (Quadro 5).

O Quadro 23 apresenta os resultados relativos à determinação do VB-C nas frações cruas e autoclavadas isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH".

QUADRO 23 - "Valor biológico calculado" das frações glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores de proteases (LIP) do feijão "IAC-Carioca 80 SH" cruas e autoclavadas

AMOSTRAS *	CRUAS	AUTOCLAVADAS
GLU	$81,5 \pm 2,2^a$	$79,1 \pm 1,7^a$
GLO	$69,9 \pm 2,9^b$	$70,7 \pm 2,1^b$
G1	$59,0 \pm 1,8^c$	$57,7 \pm 1,6^c$
ALB	$81,0 \pm 1,8^a$	$79,3 \pm 2,4^a$
LIP	$66,2 \pm 2,1^{bd}$	$62,2 \pm 2,9^{cd}$

* = os valores são referentes à média $\pm$ DP de três determinações. Em uma mesma linha, valores com letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$); em uma mesma coluna, valores com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Com base na análise estatística, não se observou diferença entre o VB-C das frações cruas e autoclavadas, ainda que, em termos absolutos, os valores obtidos para a fração LIP autoclavada tenham sido menores que aqueles relativos à fração crua.

As frações glutelinas e albuminas, cruas ou autoclavadas, apresentam valores biológicos semelhantes, significativamente superiores ao das demais frações. Ao contrário, as frações G1 e LIP são as que apresentam menor valor biológico.

4.11.2 - "Quociente de utilização protéica líquida calculado" (NPU-C)

Com o objetivo de avaliar se o quociente de utilização protéica líquida determinado *in vitro* (NPU-C) apresentou correlação significativa com NPU determinado *in vivo*, calculou-se seu valor para a farinha integral de feijão autoclavado, obtendo-se o valor de $64,0 \pm 1,7$. Este valor não apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) do valor determinado *in vivo* (Quadro 5).

O Quadro 24 apresenta os resultados relativos à determinação do VB-C nas frações cruas e autoclavadas isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH".

Dentre todas as frações, e mesmo em relação à FIA, as glutelinas autoclavadas apresentaram a melhor qualidade protéica, embora se mostrem equivalentes às globulinas, quando cruas. Nota-se também que esta fração foi a que teve maior aumento de sua qualidade protéica em consequência do tratamento térmico aplicado.

As frações ALB e GLO se equiparam em termos de qualidade de suas proteínas, cuja utilização, por sua vez, foi semelhante à da farinha integral de feijão autoclavado ($p < 0,05$).

QUADRO 24 - "Coeficiente de utilização protéica líquida calculado" das frações glutelinas (GLU), globulinas (GLO), globulina G1 (G1), albuminas (ALB) e lectinas/inibidores de proteases (LIP) do feijão "IAC-Carioca 80 SH", cruas e autoclavadas.

AMOSTRAS *	CRUAS	AUTOCLAVADAS
GLU	53,2 ± 1,7 ^a	76,0 ± 1,9 ^b
GLO	54,1 ± 2,2 ^a	66,1 ± 2,1 ^a
G1	45,6 ± 1,4 ^b	50,6 ± 1,4 ^c
ALB	45,4 ± 1,0 ^b	68,8 ± 2,1 ^a
LIP	40,6 ± 1,3 ^c	46,6 ± 2,1 ^c

* = os valores são referentes à média ± DP de três determinações. Em uma mesma linha, todos os valores apresentam diferença significativa ($p < 0,05$); em uma mesma coluna, valores com letras diferentes, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

As frações globulina G1 e LIP apresentaram utilização protéica semelhante, indicando que suas proteínas são de qualidade inferior quando comparadas às demais frações, mesmo quando autoclavadas.

Constatou-se que, ao contrário das demais frações, o tratamento térmico não aumentou a utilização das proteínas da fração LIP ($p < 0,05$), apesar de, quando considerado em termos absolutos, o NPU-C desta fração autoclavada sugerir certa melhoria em relação à fração crua.

As frações globulina G1 e LIP apresentaram utilização protéica semelhante, indicando que suas proteínas são de qualidade inferior quando comparadas às demais frações, mesmo quando autoclavadas.

V- DISCUSSÃO

5.1 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA DA FARINHA INTEGRAL DO FEIJÃO "IAC-CARIOCA 80 SH" AUTOCLAVADO.

5.1.1 - *Composição centesimal*

Em comparação com o "Carioca 80", cultivar que serviu de base para seu desenvolvimento, e que teve sua composição centesimal determinada anteriormente por TEZOTO & SGARBIERI (198), o cultivar "IAC-Carioca 80 SH" tem maior teor protéico e menor teor de cinzas e fibra bruta ($p < 0,05$).

No entanto, o teor de proteína bruta e também os teores dos demais componentes encontram-se dentro dos valores médios calculados para outros cultivares da espécie *Ph. vulgaris* (165,187).

5.1.2 - *Ensaio biológicos*

5.1.2.1 - *Balanço de nitrogênio*

Os animais apresentaram ganho de peso e balanço nitrogenado positivo ao fim dos cinco dias de duração do experimento (item 4.2.1 e Quadro 4).

A retenção de nitrogênio pelos animais alimentados com a farinha integral do feijão "IAC- Carioca 80 SH" autoclavado como única fonte protéica foi 2 a 3 vezes maior que aquela verificada

para animais alimentados em condições semelhantes, com as variedades Rico 23, Rosinha G-2, Carioca e Piratã-1 (178).

5.1.2.2 - Digestibilidade aparente (Dap) e verdadeira (Dv), valor biológico verdadeiro (VB) e quociente de utilização protéica líquida (NPU)

Em relação à digestibilidade da farinha integral autoclavada (Quadro 5), constatou-se que o valor determinado por ensaio biológico não difere do valor médio de 77% de digestibilidade para os feijões cozidos, calculado por TOBIN & CARPENTER (200), com base nos resultados de ensaios biológicos realizados por diversos pesquisadores.

Da mesma forma, enquadra-se dentro da faixa de valores de digestibilidade de 60 a 80%, relacionada por SGARBIERI (187) com base nos resultados de ensaios biológicos realizados em diversos cultivares de feijões. É superior, no entanto, à digestibilidade da maioria de cultivares brasileiros de *Phaseolus vulgaris* (7,55,56,115,178,180,198)

O valor biológico e a utilização protéica líquida da farinha de feijão "IAC- Carioca 80 SH" autoclavado mostraram-se consideravelmente superiores aos de outras variedades estudadas (165,187,200), sugerindo possível influência positiva do elevado teor de metionina biodisponível presente no cultivar (item 5.2.4).

Comparando-se os índices de qualidade protéica do feijão "IAC-Carioca 80 SH" determinados *in vivo* nesta pesquisa (Quadro 5) com os índices correspondentes da variedade que o precedeu, o "Carioca 80" (198), não se observa diferença significativa entre o valor biológico destes cultivares ($p < 0,01$).

A propósito, constata-se que o teor de metionina biodisponível do feijão "Carioca 80", determinado *in vitro* após hidrólise enzimática pelo sistema pepsina-pancreatina e quantificação da metionina no hidrolisado por reação colorimétrica com nitroprussiato de sódio ($1,55 \pm 0,07$) (198), é praticamente idêntico ($p < 0,01$) ao determinado neste estudo para o cultivar "IAC-Carioca 80 SH" (Quadro 10). Este fato pode justificar a semelhança entre o valor biológico das proteínas de ambos os cultivares.

TEZOTO & SGARBIERI (198) determinaram a digestibilidade aparente e verdadeira, bem como a utilização protéica líquida das proteínas do cultivar "Carioca 80". Contrariamente à similariedade verificada entre o valor biológico dos dois cultivares, os valores obtidos foram significativamente inferiores aos apresentados neste estudo ($p < 0,01$), o que, a princípio, poderia ser interpretado como uma superioridade do valor protéico do cultivar "IAC-Carioca 80 SH" sobre o de seu predecessor.

Neste sentido, e especificamente em relação à determinação dos índices de qualidade protéica por ensaios biológicos, a contaminação das fezes por ração espalhada pelo animal além de limites toleráveis, poderia resultar em superestimação do teor de nitrogênio fecal, com a consequente redução dos índices de digestibilidade e NPU. Neste caso, o índice do valor biológico não seria afetado, uma vez que relaciona apenas a proporção do nitrogênio retido em relação ao nitrogênio absorvido, desconsiderando, portanto, o nitrogênio excretado nas fezes.

E importante ressaltar que, durante a realização deste trabalho, procedeu-se ao desenvolvimento de um sistema para evitar

que a ração espalhada pelo animal durante sua alimentação contaminasse as fezes, o que permitiu melhorar os resultados, tendo o sistema sido adotado por outros pesquisadores no laboratório de ensaios biológicos do DEPAN/FEA.

A variedade "Aroana 80" teve seus índices de qualidade protéica determinados por DOMENE (47), a partir de ensaios biológicos realizados em condições experimentais praticamente idênticas às deste estudo. Comparando-se os resultados, não se observou diferença significativa ($p < 0,01$) entre a digestibilidade aparente e verdadeira, valor biológico verdadeiro e NPU do feijão "IAC-Carioca 80 SH" (Quadro 5) e da variedade "Aroana 80" (respectivamente, $71,24 \pm 6,05$; $74,23 \pm 6,11$; $83,50 \pm 4,67$ e $61,96 \pm 5,34$).

Como observa DOMENE (47), é preciso analisar cuidadosamente os resultados destas comparações, em função da grande variabilidade dos valores registrados, consequência de diferenças existentes quanto às condições de cultivo dos vegetais, características específicas de cultivares e, particularmente, às condições experimentais.

Em função das diferenças entre os processos de coleta de fezes e urina dos animais, optou-se, portanto, pela não comparação entre o valor protéico do "IAC-Carioca 80 SH" com o de seu predecessor (198), cujos índices de qualidade protéica não foram objeto de pesquisa neste trabalho.

Os resultados sugerem, no entanto, que o desenvolvimento do novo cultivar resultou na manutenção do bom valor protéico, característico da variedade "Carioca 80" que o precedeu.

5.1.2.3 - Estimativa do teor de metionina biodisponível

Optou-se nesta pesquisa pela adoção da metodologia desenvolvida por SGARBIERI *et al.* (178), por possibilitar avaliação mais completa da utilização de metionina que os métodos baseados no balanço metabólico do aminoácido, que ignoram a ocorrência de eventuais interações pós-absortivas que podem afetar a retenção efetiva de metionina pelo organismo.

Entretanto, foram introduzidas modificações no processo de avaliação do teor de metionina disponível na farinha. Em vez da leitura direta da concentração de metionina biodisponível na abcissa (X), como sugerido por SGARBIERI (185), concluiu-se que considerar os requerimentos do aminoácido para o rato em crescimento como base para a estimativa seria um procedimento mais adequado.

A "National Academy of Sciences" (NAS) coordenou estudos sobre os requerimentos nutricionais de ratos de laboratório, e estabeleceu o "conteúdo mínimo de nutrientes nas dietas requerido pelos animais" em diferentes situações fisiológicas (crescimento, manutenção, gestação e lactação) (208).

Particularmente em relação à metionina, o requerimento estimado para o rato em crescimento foi de 0,60g por 20g de proteína (em 100g de dieta), dos quais 1/3 deste total (ou 0,20g) são supridos por L-cistina. O requerimento estabelecido corresponde, portanto, a 0,40g de metionina por 20g de proteína, ou 2,0g de metionina/ 100g de proteína (KA).

Com efeito, é possível concluir que o teor de metionina biodisponível na farinha corresponde ao requerimento estabelecido

para o aminoácido (em g/100g de proteína da ração), deduzido da menor quantidade de metionina suplementada à dieta (em g/100g de proteína da ração) capaz de elevar o ganho de peso dos animais e o PER_{Op} das proteínas da farinha a seus valores máximos, considerando-se que:

i) as dietas utilizadas no ensaio biológico foram suplementadas com 1% de L-cistina, quantidade que ultrapassa as recomendações do NAS relativas a esse aminoácido;

ii) que a metionina adicionada às dietas é completamente utilizada pelos animais (64,185);

iii) que os requerimentos foram alcançados quando o ganho de peso dos animais e o PER_{Op} da ração atingiram seus valores máximos, igualando-se ou superando os parâmetros correspondentes obtidos para proteínas normalmente utilizadas como padrões em estudos de avaliação da qualidade nutricional de proteínas, como a caseína.

O estudo da variação do PER_{Op} e do ganho de peso dos animais em função da suplementação da dieta basal com quantidades crescentes de metionina, demonstrou que 0,4 % de metionina foi a quantidade mínima adicionada suficiente para elevar ao máximo o ganho de peso dos animais e a eficiência protéica da FIA.

Constatou-se também que o PER_{Op} da ração suplementada superou o PER da caseína, como, aliás, também observaram TEZOTO & SGARBIERI (198) em experimento semelhante realizado com o feijão "Carioca 80".

Concluiu-se, portanto, que o requerimento de metionina para o crescimento adequado dos animais foi alcançado, permitindo estimar o teor de metionina biodisponível na farinha em,

aproximadamente, 1,60 g/100g de proteína.

O valor obtido para a FIA do "IAC-Carioca 80 SH" pelo ensaio biológico apresentou excelente correlação ($p < 0,01$) com o valor determinado *in vitro* (Quadro 10). Quando expresso como percentual de metionina biodisponível em relação à metionina total, determinada na FIA por ensaio *in vitro* (Quadro 10), obtém-se o valor de 51,9%; situa-se, portanto, dentro da faixa de valores determinados *in vivo* para variedades cultivadas em outros países, ou seja, de 44 a 58%, bastante próximo de seu valor médio (57,63,64,131,133,163).

Quando comparados aos resultados de determinações realizadas em cultivares brasileiros cujos percentuais de metionina biodisponível, à exceção do "Carioca 80", variam de 29,3 a 46,3 % (7,55,56,177,178), constatou-se que o IAC-Carioca 80 SH parece apresentar maior disponibilidade de metionina. No entanto, face à ausência de dados acerca do desvio-padrão das experiências, como também em consequência da modificação introduzida no cálculo do índice, não é possível relacionar o valor percentual de metionina biodisponível do IAC-Carioca 80 SH aos determinados anteriormente a partir de ensaios *in vivo* para os cultivares brasileiros.

5.1.3 - Composição aminoacídica (exceto metionina potencialmente biodisponível)

A utilização de norleucina como padrão interno e outras providências tomadas no sentido de minimizar a variabilidade da análise, conforme sugestões de FINLEY (69), resultaram em excelente

recuperação (item 4.3).

Comparando-se a composição aminoácídica da farinha integral autoclavada do "IAC-Carioca 80 SH" (Quadro 7) com a do cultivar "Carioca 80" (198), observa-se que, apesar de maior em termos absolutos (consequência provável da utilização do padrão interno para correção dos resultados), os teores da maioria dos aminoácidos não são significativamente diferentes nos dois cultivares ($p < 0,05$).

As excessões constatadas, porém, não podem ser atribuídas exclusivamente a diferenças metodológicas. Contata-se que o teor de valina no "IAC-Carioca 80 SH" corresponde a aproximadamente 64% do teor presente no seu antecessor; por outro lado, o novo cultivar contém 3 vezes mais cisteína e mais do dobro de tirosina. E, portanto, significativamente mais rico em aminoácidos sulfurados e aromáticos totais que o "Carioca 80".

No entanto, apesar das diferenças observadas sugerirem implicações de natureza nutricional, o valor biológico das proteínas de ambas as variedades, determinado por ensaios biológicos, não diferiu significativamente (item 5.1.2.2).

Os teores cisteína, lisina e triptofano determinados na farinha crua do feijão "IAC-Carioca 80 SH" (Quadro 7) mostram-se ligeiramente superiores aos valores médios calculados por TOBIN & CARPENTER (200) com base em determinações realizadas em diversas variedades de *Ph. vulgaris* (respectivamente, 0,90, 7,1 e 1,1 g/100g de proteína crua).

Da mesma forma, o teor de cisteína é pouco superior ao teor médio de 100 variedades (0,98 g/16gN) estudadas por JAFFE & BRUCHER (98); os de triptofano e lisina, igualmente próximos aos

determinados por DURIGAN (55) em 12 cultivares brasileiros (respectivamente, 1,17 e 7,73 g/16gN).

Observando-se os teores de lisina, valina, treonina, triptofano, leucina, isoleucina e aminoácidos aromáticos totais da proteína de referência FAO/WHO 1973 (73), constata-se que os teores de todos estes aminoácidos essenciais na farinha do "IAC-Carioca 80 SH" não são limitantes à qualidade de suas proteínas, por excederem os da proteína-referência, o que pode contribuir expressivamente para a excelência do valor biológico apresentado pelas proteínas do cultivar, quando comparado a outros feijões (item 5.1.2.2).

Em relação à metionina, pode-se afirmar que a diferença verificada em relação aos teores de metionina determinados neste trabalho e os registrados na literatura é consequência da opção por registrar no Quadro 7, que apresenta a composição aminoacídica da FIA e da FCD, os valores de metionina total determinados nas farinhas pela metodologia desenvolvida nesta pesquisa, cujas implicações e resultados serão discutidos a seguir.

5.1.4 - *Metionina total e potencialmente biodisponível in vitro*

5.1.4.1 - *Considerações sobre a metodologia*

A avaliação da qualidade nutricional das frações protéicas isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH" exigiu a escolha de uma metodologia de quantificação de metionina *in vitro*, total e potencialmente biodisponível, que diferenciasse a metionina de suas

formas oxidadas, sulfóxido ou sulfona, eventualmente presentes na farinha cozida integral do feijão e de suas frações, cruas e autoclavadas (122,126). Os resultados, particularmente em relação à biodisponibilidade, deveriam ser satisfatoriamente correlacionados com os valores de metionina biodisponível *in vivo*, determinados na farinha autoclavada do feijão "IAC-Carioca 80 SH".

A oxidação da metionina a metionina sulfona pelo ácido perfórmico, seguida de hidrólise ácida e análise da quantidade de sulfona no hidrolisado, por cromatografia de troca iônica, tem sido a forma mais comum de determinação da metionina total em diversos alimentos, inclusive feijões (29,35,56,100,113,117,125,128,141,178).

Entretanto o método apresenta algumas desvantagens. De preparação demorada e, portanto, inadequado para a análise de rotina, seus resultados não expressam a quantidade total de metionina não oxidada das proteínas (51). Não corresponde, conseqüentemente, ao conceito de metionina total adotado nesta pesquisa, tendo sido descartado como opção de determinação de metionina total.

Algumas considerações acerca da adequação ou não deste método para a análise de metionina, exclusivamente em feijões, serão feitas com base não somente nas observações acima, mas também a partir de determinações realizadas neste estudo, e por outros pesquisadores.

Em 1985, o método que envolve oxidação previamente à hidrólise foi recomendado pela AOAC para a determinação de metionina total em alimentos e rações animais, a partir de um estudo colaborativo realizado por vários laboratórios (125). No entanto, alguns problemas em relação à metodologia do ácido

perfórmico têm sido descritos, especialmente quando seus resultados são comparados com outros obtidos por métodos que determinam teoricamente a metionina não oxidada na amostra.

DUNCAN *et al.* (51) determinaram a metionina não oxidada por cromatografia gasosa após reação com brometo de cianogênio e metionina "total" pelo método do ácido perfórmico em alguns alimentos. Obtiveram valores mais elevados de metionina pelo primeiro método, em leite em pó, caseína, lactoalbumina e alguns tipos de embutidos à base de sangue, concluindo que o ác. perfórmico talvez tenha pouco acesso aos resíduos de metionina nestas proteínas, provavelmente em consequência de desnaturação ácida ocorrida no processo.

Particularmente em relação aos feijões, SGARBIERI *et al.* (186) compararam os resultados de determinação de metionina em diversas variedades de feijão, por cinco métodos diferentes, dentre estes o do ác. perfórmico e o método de determinação de metionina por cromatografia gasosa após reação com brometo de cianogênio. O valor médio de metionina não oxidada determinado em oito variedades de feijão por este método foi de 1,52g/16g N. Este valor cai para 1,15g/16g N quando determinado como metionina oxidada "total" pelo método do ácido perfórmico. Os autores constataram que a determinação de metionina por cromatografia gasosa apresentou melhores resultados dentre todos os procedimentos testados.

Recentemente, MARLETTA *et al.* (128) determinaram em seis variedades de feijão, cruas e tratadas termicamente, o valor de metionina "total", após oxidação pelo ácido perfórmico e de metionina disponível, por eles denominada "reativa", a partir de digestão enzimática seguida de determinação colorimétrica pelo

método do nitroprussiato. Discutem que o teor de metionina disponível, que em quatro dos cultivares varia entre 1,28 a 1,48g/16g N, não é elevado em relação ao determinado recentemente por outros autores. Entretanto, observou-se que o valor de metionina "total" é menor que o de metionina "reativa" em alguns dos cultivares.

Em outro artigo, TEZOTO & SGARBIERI (198) determinaram metionina não oxidada presente no cultivar "Carioca 80" após hidrólise enzimática pelo sistema pepsina-pancreatina, seguida de determinação colorimétrica pelo método do nitroprussiato, e também por cromatografia gasosa após reação com brometo de cianogênio. Os resultados obtidos foram de 1,55 e 1,48g/16g N, respectivamente. O primeiro é semelhante ao procedimento utilizado neste trabalho para a determinação de metionina disponível. Utilizando basicamente a mesma metodologia, DE OLIVEIRA *et al.* (38) determinaram um teor de 1,36g/16g N de metionina disponível no mesmo cultivar. O segundo método é específico para determinação de metionina não oxidada, e apresenta estreita correlação com os resultados de metionina disponível determinados por ensaio microbiológico (60). Entretanto, o teor de metionina oxidada "total" determinada pelo método do ácido perfórmico na variedade "Carioca" por SGARBIERI *et al.* foi de 1,13g/16g N (178).

Determinou-se que o teor de metionina pelo método do ácido perfórmico na farinha integral do feijão "IAC-Carioca 80 SH" autoclavado era 1,26g/16g N para metionina oxidada "total", que é nitidamente inferior ao determinado neste estudo como potencialmente biodisponível no mesmo cultivar, que foi de 1,56g/16g N e também inferior aos valores de metionina não oxidada

disponível, determinada previamente com metodologias semelhantes por outros autores, na mesma variedade (38,198).

As dúvidas a respeito da inadequação do método de oxidação pelo ácido perfórmico para feijões foram reforçadas pela constatação de que a leguminosa não foi incluída no estudo colaborativo que resultou na recomendação para sua adoção como método oficial da AOAC (125) e, conseqüentemente, se desconhece a variação, a reprodutibilidade e a precisão do mesmo, para a análise de feijões.

Estas constatações permitem questionar a validade do método do ácido perfórmico para a determinação de metionina total em feijões, bem como o conceito de metionina "total" usado por diversos autores para se referir aos resultados obtidos a partir deste procedimento analítico. Parece que ele subestima claramente a metionina presente em feijões, talvez devido a certas características próprias desta leguminosa, que dificultam o acesso do oxidante a algumas regiões de suas proteínas. Talvez estas mesmas características possam estar relacionadas com o fato de que, dentre as proteínas vegetais, as proteínas dos feijões apresentam comparativamente digestibilidade reduzida e baixa utilização nutricional, o que lhes confere um caráter peculiar.

Talvez por não levar em conta a possibilidade de que esta metodologia seja imprópria para feijões, MARLETTA *et al.* (128) interpretaram, equivocadamente, que as variedades que apresentaram um teor de metionina "reativa" maior que o de metionina "total", apresentam "alta disponibilidade" de metionina. Os ensaios em animais demonstram que, provavelmente, ela não será maior que 58% do total e, conseqüentemente, o mais provável é que a determinação

do teor de metionina "total", tanto pelo método da pré-oxidação pelo ácido perfórmico como por hidrólise ácida e troca iônica, não correspondam ao teor real de metionina presente no feijão.

Além do mais, não parece correto considerar como parte do "total" de metionina, sua sulfona, destituída de valor biológico e mesmo seu sulfóxido, estreitamente correlacionado com a redução do valor biológico das proteínas.

O problema em relação à determinação de metionina total, inclusive de acordo com o conceito adotado neste estudo, parece ter sido satisfatoriamente resolvido com o desenvolvimento de um método que utiliza hidrólise alcalina das amostras e quantificação da metionina não-oxidada presente no hidrolisado pelo método da Cloramina-T.

A opção pela hidrólise alcalina foi baseada no fato de que o sulfóxido de metionina presente na proteína analisada é estável nestas condições, não sendo reduzido a metionina, como ocorre durante a hidrólise ácida (26,33,169), como também em função da relativa estabilidade do aminoácido nestas condições (35,147). A hidrólise alcalina tem sido frequentemente considerada como uma opção na determinação de Met-O (33,105,142,147,159,173). Consequentemente, pode-se esperar que a metionina não oxidada originalmente presente na amostra vai estar presente no hidrolisado e, consequentemente, não será determinada.

O procedimento escolhido foi baseado no de JORI *et al.* (105), utilizado para a determinação de metionina e sulfóxido de metionina em lisozima. Foram realizadas pequenas adaptações em função de particularidades do processo de hidrólise alcalina. Dentre estas, deve-se destacar a importância do pré-resfriamento do

hidrolisado antes da neutralização, a qual por gerar calor excessivo no meio de reação, pode levar ao escurecimento da amostra. Nas amostras de farinha de feijão, é importante utilizar areia lavada sobre a placa porosa, para com auxílio de uma espátula, romper o gel de amido formado no processo, o qual pode reter hidrolisado, afetando a recuperação (31). As pequenas aliquotas de hidrolisado neutralizado tomadas para análise colorimétrica não afetam o pH do meio de reação com a Cloramina-T, em consequência da ação do tampão e das diluições efetuadas no processo. A medida do pH no meio de reação foi realizada periodicamente, para assegurar que a neutralização do hidrolisado tinha sido correta.

Em geral, os métodos descritos para a determinação *in vitro* dos aminoácidos sulfurados biodisponíveis utilizam um sistema enzimático que apresenta boa correlação com a digestibilidade observada *in vivo*, seguida de quantificação do teor do aminoácido presente no hidrolisado, por técnicas diversas (13,28,38,62,78,85, 95,108,128,154,155,160,171,172,186,198,212).

Optou-se neste estudo por utilizar o sistema pepsina-pancreatina para a digestão das proteínas. O método apresentou boa correlação com os resultados de digestibilidade *in vivo* ($p < 0,01$) e foi o método escolhido para o acompanhamento da liberação enzimática de metionina *in vitro*.

A metodologia para a determinação de metionina não oxidada em hidrolisados por reação colorimétrica com o nitroprussiato tem sido frequentemente modificada, seja para melhorar sua pequena sensibilidade, seja para eliminar interferências existentes na reação de coloração, como alguns

metais e resíduos de S-metilmetionina livres, normalmente presentes em feijões (13,123,130,197).

Por outro lado, a quantificação por cromatografia gasosa do isotiocianato formado a partir da reação com brometo de cianogênio, requer alguns equipamentos de segurança e manipulação de substância tóxica, o que traria problemas em análises de rotina. Além disso, prevê uma preparação prévia das amostras, para eliminar substâncias interferentes que estão presentes nos feijões, como a gama-glutamil-S-metil cisteína (9,50,52,130).

Testou-se o método de determinação colorimétrica de metionina pela Cloramina-T (201), com o objetivo de avaliar sua precisão na quantificação de metionina não oxidada, tanto em hidrolisados enzimáticos, quanto alcalinos.

As recuperações de metionina obtidas a partir da determinação de seu conteúdo em soluções aquosas formuladas com quantidades conhecidas do aminoácido, foram consideradas satisfatórias, mesmo na presença de triptofano e cisteína, que poderiam interferir na análise caso as condições do meio de reação não estivessem adequadas (Quadro 8). Pela sensibilidade elevada que o método apresenta, constatou-se a necessidade de se dispor de um padrão de L-metionina novo e de boa qualidade para uma determinação precisa.

Considerou-se igualmente satisfatória a recuperação de metionina de soluções submetidas às condições de hidrólise alcalina, utilizadas na determinação de metionina total e quantificadas nos hidrolisados pelo método da Cloramina -T (Quadro 9).

Neste caso, os estudos de padronização mostraram menor recuperação de metionina em função do tratamento alcalino (Quadros 8 e 9). O teor de metionina calculado para a ovalbumina foi comparado com o determinado na mesma proteína por hidrólise alcalina, seguida de determinação da metionina não oxidada presente no hidrolisado alcalino pelo método da Cloramina-T. O resultado foi muito bom (Quadro 9), sugerindo que a perda do aminoácido constatada na hidrólise alcalina de soluções de aminoácidos, talvez seja menor quando são analisadas proteínas ou alimentos, onde a metionina estaria de certa forma protegida por mais tempo durante o processo.

Com base nestes resultados, optou-se pela quantificação de metionina pela Cloramina-T, uma vez que pode ser realizada em hidrolisados enzimáticos ou alcalinos, e portanto utilizada para determinar tanto a metionina biodisponível como a total; é específica para a quantificação de metionina não oxidada, com excelente sensibilidade e permite efetuar um grande número de análises em tempo relativamente curto, com bastante confiabilidade.

Além do mais, como ficou constatado, apresentou pouca variabilidade entre resultados obtidos para uma mesma amostra, em determinações sucessivas realizadas em hidrolisados alcalinos e enzimáticos ao longo do tempo de duração do estudo.

5.1.4.2 - *Considerações sobre os teores de metionina total e biodisponível determinados in vitro nas farinhas*

Os valores de metionina total determinados na farinha integral de feijão autoclavado (FIA) e na farinha de feijão cru

descorticado (FCD) foram surpreendentemente altos (Quadro 10), especialmente quando comparados com a maioria dos teores de metionina total descritos e compilados por TOBIN & CARPENTER (200) e SGARBIERI (187), a partir de inúmeras variedades de feijões.

No entanto, constatou-se que a maioria dos métodos para determinação de metionina total utiliza hidrólise ácida seguida da quantificação de metionina no hidrolisado ácido por colorimetria ou por cromatografia de troca iônica, ou determinação pelo método da oxidação por ácido per fórmico, que não parecem adequados para a análise do aminoácido.

Não existem na literatura dados acerca de determinação de metionina em feijões a partir de hidrólise alcalina. Consequentemente, não há como comparar os resultados deste trabalho com os de outros pesquisadores, a não ser quando utilizam outra metodologia. Neste sentido, LANTZ *et al.* (116) observaram uma variação entre 2,5 e 3,1g/16g N nos teores de metionina de oito variedades de *Phaseolus vulgaris*, determinados a partir de ensaio microbiológico.

Entretanto, uma série de constatações enumeradas a seguir, permite considerar o método como uma alternativa válida para a determinação de metionina total em proteínas, particularmente em feijões:

1) os estudos de recuperação de metionina a partir de soluções submetidas à hidrólise alcalina apresentaram resultados satisfatórios, como também aproximou-se do teor de metionina total estimado para a ovalbumina (Quadro 9).

2) é pouco provável a presença de interferências na reação colorimétrica. A determinação de metionina por Cloramina-T

apresenta alta seletividade para com o aminoácido (26,176). Os resultados apresentados nos Quadros 8 e 9 indicam que a possível interferência em função da presença no hidrolisado de grupos amino livres, triptofano ou cisteína foi corretamente eliminada pelo tratamento com DEPC, que precede à reação com a Cloramina-T.

Por outro lado, os hidrolisados das frações protéicas e farinha crua descorticada eram límpidos e claros. Os da FIA, apesar de límpidos, apresentavam suave coloração marron-amarelada, provavelmente devido à ocorrência, durante a hidrólise, de reação de Maillard e/ou interações envolvendo os compostos polifenólicos presentes na casca com outros componentes do grão.

Entretanto, em consequência das diversas diluições realizadas durante a execução do método, observou-se que, ao final da preparação da amostra, estas soluções sempre se apresentaram límpidas e incolores no meio de reação, mesmo no caso da FIA. Além do mais, para maior segurança, utilizou-se um branco com o qual o aparelho foi zerado.

3) Recentemente, GEORGE *et al.* (86) determinaram as quantidades de metionina presentes em amostras do feijão "IAC-Carioca 80 SH" e do cultivar "Carioca". O procedimento adotado foi o DE LUMEN & KHO (36), baseado na alquilação específica do grupo tioéter da metionina em pH 2 pelo ácido 1-¹⁴C-iodoacético em pH 2, após extração das proteínas e separação por eletroforese em gel de poliacrilamida. O teor de metionina total é então determinado por densitometria a partir de autoradiografias das bandas resolvidas. O teor percentual de metionina foi calculado por comparação com a anidrase carbônica, um marcador com peso molecular de 31000 daltons e contendo 3 Met/ mol de proteína.

Os resultados obtidos reforçaram as suposições de que os elevados teores de metionina total determinados na FIA e na FCD pelo método alcalino não são irreais. Foram identificados no extrato obtido a partir dos grãos crus descorticados do "IAC-Carioca 80 SH" e do "Carioca", proteínas contendo teores elevados de metionina, variando de 2,39 a 3,14g/16g N e de 2,70 a 3,50g/16g N, respectivamente.

4) Observou-se a inexistência de qualquer correlação entre os resultados da determinação de metionina total e biodisponível *in vitro* em feijões, quando se utilizam os resultados de metionina "total" obtidos pelo método do ácido perfórmico, como também foi constatado por MARLTTA *et al.* (128).

Com efeito, pode-se esperar um teor de metionina total, nos feijões, variando entre 2,71 e 3,29g/16g N, valores que foram projetados relacionando-se o percentual médio de disponibilidade em feijões, determinados por ensaios biológicos, com os teores médios de metionina disponível determinados por ensaios *in vitro*, considerando que:

i) a análise da literatura acerca dos percentuais de biodisponibilidade de metionina determinados *in vivo* em 10 variedades de *Phaseolus vulgaris* por diversos autores, revela que ela pode variar entre 29,3 e 58,0%; portanto, em termos médios apenas 45% da metionina total pode ser utilizada pelos animais (7,18,63,64,131,178,198). Nesta pesquisa, o percentual de metionina biodisponível estimado *in vivo* correspondeu a 51,9% da metionina total, dentro, portanto, dos valores determinados;

ii) valores de metionina não-oxidada determinados em hidrolisados enzimáticos de 7 variedades de feijão por reação

colorimétrica com o nitroprussiato, que teoricamente se aproximam do conceito de disponibilidade nutricional do aminoácido, variam de 0,95 a 1,48g/16g N (38,128,198), o que representa um teor médio de 1,22g Met/16g N;

iii) valores de metionina determinados em 13 variedades de feijões brasileiros por cromatografia gasosa após reação com brometo de cianogênio (56,198) variaram de 0,96 a 1,99g/16g N, o que representa um teor médio de 1,48g Met/16g N;

5) Particularmente neste estudo, relacionando-se o percentual de metionina biodisponível estimado por ensaio biológico (1,60g Met/16g N) com o teor de metionina disponível determinado *in vitro* após hidrólise enzimática ($1,56 \pm 0,02$ g/16g N), observou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os percentuais de metionina disponível determinados *in vitro* e *in vivo* na FIA.

Recomenda-se a realização de mais estudos a respeito, para que a contribuição apresentada neste trabalho em relação à determinação de metionina total em feijões possa ser confirmada e utilizada com vantagens por outros pesquisadores.

Em relação à metionina biodisponível, observou-se que os resultados obtidos por sua determinação *in vitro* na farinha integral de feijão autoclavado do "IAC-Carioca 80 SH" (Quadro 10), não apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparados aos teores de metionina biodisponível determinados por TEZOTO & SGARBIERI (198) na mesma variedade, tanto pelo método que utiliza cromatografia gasosa após reação com brometo de cianogênio, como pelo método que determina a metionina presente no hidrolisado resultante da digestão da farinha pelo sistema pepsina/pancreatina por reação colorimétrica com o nitroprussiato ($1,48 \pm 0,18$ e

1,55 $\pm$ 0,07g/16g N, respectivamente).

O teores de metionina da farinha crua descorticada foram inferiores aos da farinha integral autoclavada ($p < 0,01$), embora não se tenha observado diferença significativa entre os teores de todos os outros aminoácidos nas duas farinhas ($p < 0,01$) (Quadros 7 e 10). Suspeita-se que parte da metionina livre presente no endosperma possa migrar durante a maceração para regiões externas do grão, sendo assim parcialmente retiradas, juntamente com o pericarpo, quando da descorticação dos feijões.

Observando-se o Quadro 8, que apresenta a composição aminoacídica da FCD e da FIA do "IAC-Carioca 80 SH", constata-se que foram utilizados os valores de metionina e cisteína total determinados nesta pesquisa. Uma comparação entre o teor de aminoácidos sulfurados totais (AST) da proteína referência FAO/WHO 1973 (73) e a soma de metionina e cisteína totais na FIA ou FCD, pode a princípio sugerir que as proteínas do cultivar não sejam limitantes em AST, o que, no entanto, não corresponde à realidade.

Quando consideram-se os teores biodisponíveis destes aminoácidos na FIA obtida do cultivar, ou seja, 1,56g Met/16g N (Quadro 10) e, aproximadamente 0,46g Cys/16g N, calculado a partir da correção do teor de cisteína total determinado neste trabalho (Quadro 7) pelo percentual médio de 44% de cisteína disponível determinado para seis variedades de *Ph. vulgaris* (128), obtém-se um teor de AST de 2,02g/16g N, atribuindo às proteínas do cultivar um escore aminoacídico de aproximadamente 58%, quando a proteína-referência da FAO (73) é empregada como base para o cálculo. Confirmou-se, portanto, que a deficiência em AST é a principal limitação à qualidade das proteínas do cultivar "IAC- Carioca 80

SH", como nos outros feijões, em geral.

Concluiu-se que o feijão "IAC-Carioca 80 SH" possui um teor elevado de metionina biodisponível quando comparado com outras variedades, assim como seu predecessor, o "Carioca 80", ainda que em termos percentuais, encontre-se próximo ao valor médio determinado *in vivo* para muitos outros cultivares (57,63,64,131,133,163).

5.1.5 - *Digestibilidade in vitro da farinha integral de feijão autoclavado.*

Em função da utilização biológica de uma proteína estar diretamente relacionada com a velocidade, a ordem de liberação e a composição dos aminoácidos essenciais resultante de sua hidrólise pelas peptidases gástricas, pancreáticas e intestinais, os métodos de determinação da digestibilidade protéica *in vitro* têm sido utilizados como base da estimativa do valor biológico das proteínas e da biodisponibilidade de seus aminoácidos essenciais. Estes vêm sendo amplamente utilizados em substituição aos ensaios biológicos, que normalmente requerem grandes quantidades de amostra, são caros, demorados e impróprios para análises de rotina (126,129,191,194). Os diversos métodos desenvolvidos procuram se correlacionar ao máximo com os resultados *in vivo*; conseqüentemente a grande maioria deles emprega enzimas gástricas e/ou pancreáticas e intestinais de mamíferos (126).

AKESON & STAHPMAN (3) comprovaram que o sistema enzimático pepsina-pancreatina permite excelente correlação com os resultados

in vivo, qualidade posteriormente confirmada por outros autores (92,168). ROMERO & RYAN (162) afirmaram que metodologias desenvolvidas posteriormente, utilizando outros sistemas enzimáticos, não resultaram em aumento substancial das correlações com os resultados *in vivo*. O método vem sendo utilizado por inúmeros pesquisadores, tanto para avaliar a digestibilidade de diversas proteínas alimentares, como para estimar o valor biológico de proteínas ou a biodisponibilidade de seus aminoácidos essenciais (3,35,38,82,83,92, 113,154,155,170,171,172,183,191).

Consequentemente, optou-se nesse estudo pela utilização do sistema pepsina-pancreatina, conforme metodologia de AKESON & STAHPMAN (3), modificada por GALEAZZI (82), utilizando-se uma relação enzima:substrato de 1:22 para a pepsina e a pancreatina, próxima à relação de 1:25 empregada por por outros autores (83,170). Esta metodologia tem sido rotineiramente empregada para a determinação da digestibilidade *in vitro* em diversos alimentos, com bons resultados.

A determinação da digestibilidade *in vitro* das proteínas da FIA pelo método escolhido teve por objetivo confirmar se sua correlação com os resultados *in vivo* é de fato significativa, uma vez que a metodologia adotada seria empregada tanto para a avaliação da qualidade protéica das frações, como para o desenvolvimento da metodologia de determinação de metionina biodisponível *in vitro*.

Não se observou diferença significativa em relação aos valores de digestibilidade da FIA, determinados *in vivo*, enquanto que a digestibilidade da caseína foi a esperada (Quadro 11). Em relação à farinha crua descorticada, observou-se um valor

ligeiramente superior aos determinados por HERNANDEZ *et al.* (92), com base na mesma metodologia, para feijões crus, brancos, marrons e negros (respectivamente, 50,9, 57,3 e 55,9 %). Esta diferença foi atribuída, no entanto, ao fato de que os autores citados analisaram a farinha de feijão integral, cujo teor de componentes fenólicos presentes na casca, reconhecidamente, implica em redução da digestibilidade de suas proteínas (24,97,144,157,162). Os resultados foram considerados satisfatórios.

5.2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, BIOQUÍMICA E NUTRICIONAL DAS FRAÇÕES ISOLADAS.

5.2.1 - *Fracionamento: balanço de massa e contribuição protéica das frações isoladas*

Separadas com base na solubilidade característica, inerente a cada grupo de proteínas dos grãos, as diferentes frações isoladas apresentaram graus de pureza variando de 74 a 86%, à exceção da fração de glutelinas (Quadro 12).

Possivelmente em função das condições especiais de extração destas proteínas, capazes de solubilizar componentes não-protéicos alcali-solúveis presentes na farinha, as glutelinas contidas na fração representaram apenas 48% de seu peso. Da mesma forma, LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (115) constataram que a fração de glutelinas por eles extraída de grãos de *Ph. vulgaris* continha em torno de 40% de impurezas, atribuindo o fato à presença, na fração, de componentes fibrosos alcali-solúveis.

A globulina G1, de acordo com o esperado, é a proteína predominante no feijão e, juntamente com outras globulinas,

representam aproximadamente 51% das proteínas totais dos grãos. As proteínas presentes na fração álcali-solúvel, compostas principalmente por glutelinas, constituem 23% do total de proteínas.

Quando consideradas em conjunto com a globulina G1, observou-se que representam aproximadamente 2/3 das proteínas contidas no cultivar estudado (Figura 3). Estes resultados mostraram-se de acordo com os obtidos por LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (113) pelo fracionamento dos grãos do feijão "Carioca".

A presença de apenas 3% de proteína insolúvel remanescente na fração fibrosa, indica que a eficiência do processo de extração das proteínas foi adequada. Em face da pequena contribuição das prolaminas em relação às proteínas totais do feijão, estimada em apenas 1,7% das proteínas presentes nos grãos (113), optou-se por sua não inclusão nesse estudo.

5.2.2. - Teor de carboidratos, atividade antitriptica e hemaglutinante em cada fração.

Constatou-se que a maior quantidade de carboidratos esta presente na fração LIP. Não se verificou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de carboidratos contidos nas demais frações.

A fração LIP concentrou também a maior parte das atividades antitriptica e hemaglutinante das proteínas do feijão, respectivamente, 89 e 77% do total. Quando consideradas juntamente com as proteínas da fração ALB, que apresentaram valores intermediários, a contribuição percentual alcança 97 e 87 % do

total, respectivamente.

Em relação à atividade hemaglutinante, observou-se que seu valor na Globulina G1 foi maior que o esperado, provavelmente em consequência de precipitação de uma fração de lectinas pela saturação do sobrenadante em que estavam contidas, quando da adição de sulfato de amônia (Figura 1).

A desnaturação das proteínas em função das condições alcalinas de extração da fração glutelinas resultaria em perda da atividade biológica de suas proteínas (117), o que talvez tenha sido a causa de que, ao contrário das demais frações, as glutelinas não tenham apresentado qualquer atividade antitriptica ou hemaglutinante.

5.2.3 - Composição aminoacídica

De forma a obter maior precisão na determinação da composição aminoacídica das frações, fundamental para que a avaliação da qualidade de suas proteínas *in vitro* correspondesse adequadamente aos resultados que seriam obtidos utilizando-se ensaios *in vivo*, optou-se pela adoção do procedimento baseado na quantificação dos resíduos de feniltiocarbamil-aminoácidos por cromatografia líquida de fase reversa (HPLC). A par de sua grande sensibilidade, o método representa um grande avanço na obtenção de maior precisão e reprodutibilidade na quantificação dos aminoácidos, quando comparado ao método tradicional que utiliza a cromatografia de troca iônica para separação dos resíduos, seguida de quantificação a partir de reação colorimétrica com ninhidrina (30).

O exame da composição aminoacídica das frações cruas (Quadro 14) revelou que a Globulina G1, principal proteína do feijão, é de todas elas a mais limitada em metionina total e triptofano. Os teores aminoacídicos das frações globulina e globulina G1 não apresentaram diferença significativa, exceto em relação a esses aminoácidos, menos limitantes nas globulinas. São também, dentre todas as frações, as que possuem menos treonina, cisteína e lisina. A má qualidade da composição aminoacídica das globulinas e da globulina G1, que juntas respondem por mais de 50% das proteínas totais do feijão (Figura 3), certamente deve ser um fator decisivo para que as proteínas dos feijões apresentem qualidade nutricional reduzida.

Ao contrário, as proteínas da fração albuminas e as glutelinas possuem melhores teores de aminoácidos essenciais que as demais frações.

As glutelinas são as proteínas do feijão mais ricas em lisina e metionina total. Possuem também um teor elevado de triptofano, no que são superadas apenas pelas albuminas. Contém, no entanto, pouca cisteína e dentre todas as frações, suas proteínas são as mais limitadas em fenilalanina. Observou-se porém, que se considerar também seu conteúdo de treonina, o teor de aminoácidos aromáticos totais das glutelinas supera o da proteína do ovo integral (189).

Uma composição aminoacídica particularmente rica em prolina constitui-se numa das características comuns às prolaminas e glutelinas (202). As glutelinas do cultivar "IAC-Carioca 80 SH" apresentaram um teor elevado do aminoácido. Observou-se que glutelinas isoladas de quatro variedades de milho apresentaram igualmente teores elevados de prolina, com valores variando entre

13,9 a 20,4g/16g N para o milho verde e de 12,2 a 22,3g/16g N para o milho seco (174). Da mesma forma, as glutelinas do trigo apresentam teores elevados do aminoácido, superiores a 10,0g/16g N (127). Os resultados sugerem que as glutelinas das leguminosas sejam talvez mais ricas em prolina que as glutelinas dos cereais, ainda que algumas destas proteínas no milho possuam teores deste aminoácido semelhantes aos encontrados na fração glutelinas do feijão estudado.

As albuminas apresentaram uma composição aminocídica de qualidade e, em geral, mais equilibrada, não apresentando aminoácidos em falta ou excesso, expressivos em relação aos teores presentes nas demais frações. São as proteínas mais ricas em triptofano e cisteína, e inferiores às glutelinas quanto aos teores de lisina e metionina total. Ainda que se mostrem mais ricas em fenilalanina que as glutelinas, não se observou diferença significativa entre as proteínas das frações ALB e GLU quanto aos teores dos outros aminoácidos essenciais, Tre, Leu, Ile, His e Val. Da mesma forma, LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (115) constataram que as glutelinas e as albuminas contêm a maior parte da metionina e cisteína do feijão "Carioca".

A fração LIP é especialmente rica em treonina e valina. Embora apresente comparativamente um teor elevado de metionina total, é pobre em cisteína. São, dentre todas proteínas isoladas, as mais limitantes em lisina e histidina, possuindo também teores reduzidos de triptofano. No entanto, contêm teores elevados de alguns aminoácidos não-essenciais: Ala, Gly, Asp e Ser.

Correlacionando-se os valores de aminoácidos de cada uma das frações cruas com seus correspondentes nas frações autoclavadas

(Quadros 14 e 15, respectivamente), observa-se que, em geral, as composições aminoacídicas das frações cruas e autoclavadas não diferiram significativamente ($p < 0,05$). Constatou-se, entretanto, algumas exceções.

O tratamento térmico empregado parece ter afetado o teor de alguns aminoácidos, a maioria deles essenciais, como a cisteína, a metionina e a lisina, tiveram seus teores significativamente reduzidos ($p < 0,05$) em todas as frações autoclavadas. A prolina foi afetada pela autoclavagem das frações GLO, ALB e LIP, enquanto a leucina e a histidina tiveram seus teores reduzidos em função do tratamento térmico aplicado à fração globulinas.

E reconhecida a labilidade da cisteína e da lisina frente ao tratamento térmico (65,66,187,200). Estudos de DONOSO *et al.* (48) sobre os danos provocados aos aminoácidos pelo tratamento térmico revelaram que proteínas de carne de porco diluídas em água e aquecidas a 110°C por 24h apresentaram redução em seus teores de cistina, lisina, prolina, leucina, metionina e histidina de, respectivamente, 44, 34, 33, 20, 16 e 8% do conteúdo desses aminoácidos, na proteína original. É possível concluir que os aminoácidos afetados são termolábeis em graus variáveis, e que a autoclavagem das proteínas isoladas nas condições desse estudo resultou em perda variável desses aminoácidos.

Constatou-se que, proporcionalmente, os maiores danos aos aminoácidos em geral ocorreram na fração LIP, o que pode ser explicado pela presença, nesta fração, de maiores teores de carboidratos, que sob ação do calor podem reagir com resíduos aminoacídicos resultando em sua destruição (48,65).

A destruição da cisteína pelo tratamento térmico foi significativa em todas as frações isoladas. Entretanto, seu teor no feijão não parece ter sido afetado pela autoclavagem, já que não se constatou diferença significativa ($p < 0,05$) entre seus teores na FCD e na FIA (Quadro 7), sugerindo que nas proteínas puras os resíduos estariam mais expostos, resultando em perdas mais significativas do aminoácido.

O teor de cisteína das glutelinas pode estar subestimado, não só em consequência do tratamento térmico, mas também em função da utilização de solução alcalina para a extração destas proteínas, o que poderia induzir a alguma perda no teor original do aminoácido sulfurado contido na proteína nativa, posteriormente ainda mais reduzido após autoclavagem da fração. Cistina e cisteína são, dentre todos os aminoácidos, os mais afetados pelo pH alcalino. Podem formar dehidroalanina como resultado de dessulfuração, o qual pode reagir com o grupamento E-amino- da lisina e formar lisinoalanina. Resíduos de cistina ou cisteína podem reagir também com a ornitina, livre ou ligada, formando ornitinoalanina. Pode reagir também com outro resíduo de cisteína, livre ou ligada, formando lantionina; ou com água, para formar D-L-serina ou amida pirúvica. Estas reações resultam na formação de pontes não peptídicas resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas, com consequente redução da utilização destas proteínas (35,40,81,89,117).

DE RHAM *et al.* (40) constataram que, entretanto, os danos ao aminoácido sulfurado são proporcionalmente menores quando o tratamento alcalino é realizado à temperatura ambiente.

5.2.4 - Digestibilidade *in vitro*

O tratamento térmico melhorou significativamente a digestibilidade das proteínas de todas as frações. Em termos percentuais, o aumento foi de 55, 42, 22 , 21 e 14% para as frações ALB, GLU, LIP, GLO e G1, respectivamente (Quadro 16).

Observou-se que a fração ALB, quando crua, apresentou a menor digestibilidade dentre todas as frações, enquanto a fração LIP em seu estado nativo apresentava digestibilidade semelhante às glutelinas cruas. O tratamento térmico induziu a um aumento expressivo na digestibilidade das albuminas e das glutelinas.

As frações LIP e ALB cruas apresentaram valores de digestibilidade elevados, se considerados os altos teores de inibidores de enzimas digestivas presentes nestas frações, especialmente na fração LIP o que, em parte, poderia ser atribuído ao excesso de enzima em relação ao substrato utilizado no procedimento adotado nesta pesquisa (82).

Quando desnaturadas pelo calor, entretanto, as lectinas e os inibidores de proteases se tornaram as proteínas de menor digestibilidade dentre todas as frações, possivelmente em consequência da presença residual de inibidores de enzimas digestivas resistentes ao tratamento térmico (45,165,182,187), e/ou da formação de agregados protéicos de alto peso molecular, resistentes ao ataque enzimático, favorecida pelo calor e pelo alto teor de carboidratos presentes na fração (45,113).

Se por um lado, a digestibilidade *in vitro* da globulina G1 coincidiu com o valor determinado *in vivo* por LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (115) no cultivar "Carioca", a digestibilidade das

glutelinas e das albuminas foi consideravelmente maior que os valores encontrados por esses autores. No entanto, o cultivar "Carioca" é geneticamente diferente do "IAC-Carioca 80 SH". Os resultados desta pesquisa vêm demonstrando diferenças entre o valor nutritivo das duas variedades. Em relação à digestibilidade *in vivo* da farinha integral de feijão autoclavado, por exemplo, a digestibilidade aparente da farinha do feijão "IAC-Carioca 80 SH" foi aproximadamente 13 % maior que a digestibilidade aparente da farinha integral do "Carioca 80" (115).

O aumento expressivo na digestibilidade da fração glutelinas induzido pelo tratamento térmico sugere que as condições de extração destas proteínas foram adequadas. Tratamentos alcalinos mais drásticos poderiam afetar significativamente a digestibilidade dessas proteínas, em função da ocorrência de diversos tipos de reações, discutidas no item 5.2.3 (35,40,81,89,117).

Existem evidências de que, em geral, as proteínas isoladas apresentam digestibilidade maior do que a digestibilidade da farinha a partir da qual foram extraídas. SGARBIERI *et al.* (180) constataram que a digestibilidade da farinha crua do cultivar Rosinha G2, 59%, foi consideravelmente menor do que a determinada para o isolado protéico total (73%), albuminas (72%) e globulinas (83%). Também no estudo *in vivo* de LANFER-MARQUEZ & LAJOLO (115), a digestibilidade da farinha integral do feijão "Carioca 80", 65,4%, foi significativamente inferior à digestibilidade das albuminas e globulinas isoladas a partir desta mesma farinha (79,5 e 94,0 %, respectivamente).

5.2.5 - Metionina potencialmente biodisponível in vitro.

Os resultados apresentados no Quadro 17 indicaram que, em termos absolutos, a fração de glutelinas, crua ou autoclavada, apresentou o maior teor de metionina potencialmente biodisponível dentre as frações isoladas. As frações GLO e ALB autoclavadas possuem teores semelhantes, enquanto a globulina G1, principal proteína do feijão, apresentou baixos teores de metionina biodisponível, tanto crua como após tratamento térmico.

As lectinas e inibidores de proteases contribuíram com menos metionina potencialmente biodisponível que as demais frações, provavelmente em consequência da redução expressiva de seu teor de metionina total após autoclavagem, o que poderia refletir sobre a quantidade liberada enzimaticamente, em termos absolutos. Pelo exame dos Quadros 14 e 15, constatou-se que o teor de metionina total da fração LIP foi reduzido em 48% em consequência do tratamento térmico.

Concluiu-se que o teor de metionina potencialmente disponível nas proteínas da fração LIP autoclavada pode estar subestimado, embora, em função da presença de altos teores de carboidratos nesta fração, não se possa descartar a ocorrência de interações, induzidas pelo calor, que poderiam resultar na redução da biodisponibilidade de alguns aminoácidos de proteínas, dentre os quais a metionina, como observaram alguns autores (48,55,65,190).

Quando os resultados foram interpretados em termos dos percentuais de metionina potencialmente biodisponível das frações cruas e autoclavadas (Figura 5), constatou-se que o tratamento térmico resultou, em geral, no aumento da liberação de metionina

das proteínas do feijão.

Dentre todas as frações, as albuminas sofreram maior influência do tratamento térmico, cuja liberação de metionina foi 189% maior que na fração crua; com relação às frações G1, GLO e LIP o aumento variou de 47 a 69%.

A liberação de metionina pelas enzimas digestivas das proteínas da fração GLU, entretanto, aparentemente não foi favorecida pelo tratamento térmico. Apesar do expressivo aumento na digestibilidade das glutelinas induzido pela autoclavagem da fração (Quadro 16), constatou-se um aumento de apenas 1% na liberação de metionina das glutelinas autoclavadas (Quadro 17), sem significância estatística, pois o percentual de metionina potencialmente biodisponível contido na fração crua não diferiu do percentual determinado após autoclavagem da fração ($p < 0,05$).

É preciso considerar que o teor de metionina biodisponível nas glutelinas pode estar subestimado, ainda que em pequenas proporções, em consequência do procedimento utilizado para a extração destas proteínas.

O tratamento alcalino pode resultar em redução na biodisponibilidade dos aminoácidos de uma proteína em consequência de ocorrência de:

1) racemização, uma vez que a formação de D-aminoácidos ou ligações peptídicas L-D, D-L ou D-D resulta em bloqueio do ataque enzimático por parte das proteases (81,89). A ocorrência de racemização de parte da metionina contida nas glutelinas durante o processo de extração poderia explicar a incapacidade do tratamento térmico em aumentar a liberação enzimática do aminoácido contido nesta fração. Neste caso, os D-isômeros teriam sido formados na

fração ainda crua, e como tal permaneceriam após autoclavagem, da mesma forma não disponíveis ao ataque enzimático.

ii) perda de sítios específicos para o ataque enzimático como resultado da destruição de aminoácidos, particularmente cistina e lisina (117). Esta hipótese, entretanto, foi considerada menos provável, uma vez que os estudos que comprovaram perdas efetivas na biodisponibilidade dos aminoácidos em função de tratamentos alcalinos empregaram condições mais drásticas que as utilizadas para a extração das glutelinas nesta pesquisa (40,89,117,172).

Pelo exame dos percentuais de metionina potencialmente biodisponível fornecidos por cada fração, em relação ao total das proteínas extraídas (Figura 6), constatou-se que a fração glutelinas foi, dentre todas as frações, a que proporcionalmente mais contribuiu com metionina. Esta contribuição pode ser ainda maior, caso sejam corretas as suposições de que os teores de metionina biodisponível nesta fração podem estar subestimados.

A Globulina G1 possui menos metionina que as frações GLU, GLO e ALB, no entanto, sua contribuição em relação à metionina biodisponível foi tão expressiva quanto a das glutelinas, provavelmente pelo fato de constituir em cerca de 37% das proteínas do feijão.

As glutelinas e a Globulina G1, que juntas correspondem a aproximadamente 60% das proteínas extraídas do feijão, forneceram em torno de 2/3 da metionina liberada pela proteólise da farinha autoclavada do "IAC-Carioca 80 SH". As globulinas (G1 e GLO) correspondem a mais de 50% das proteínas totais do feijão e contribuíram com aproximadamente 46% da metionina potencialmente

biodisponível. As frações ALB e LIP foram as que apresentaram menor contribuição do aminoácido.

5.2.6 - *Grau de hidrólise e liberação de metionina das frações protéicas cruas autoclavadas.*

Constatou-se que ao final das 6h de duração dos experimentos, foram liberados de 86 a 94% do total previsto de aminoácidos a serem liberados na proteólise das frações cruas e autoclavadas, após correção de seus valores de digestibilidade, como também de 87 a 96 % dos resíduos de metionina potencialmente biodisponível de cada uma delas.

A desnaturação térmica favoreceu consideravelmente a ação da pepsina sobre as globulinas e albuminas, que ao final das 3h de proteólise liberaram em torno 65 e 49%, respectivamente, mais equivalentes de aminoácidos do que quando em seu estado nativo. O efeito foi proporcionalmente menor na Globulina G1 (26,5%). Ao final das 6h de proteólise, estas frações, quando desnaturadas, apresentaram aumentos expressivos na sua digestibilidade (Quadros 18 e 19 e Figuras 7 a 9).

A desnaturação das glutelinas e das lectinas e inibidores de enzimas digestivas, ao contrário, não favoreceu a ação da enzima. Se com relação às glutelinas constatou-se um aumento de apenas 2,5% na liberação de resíduos aminocídicos pela pepsina das proteínas tratadas termicamente, o teor liberado da fração LIP desnaturada foi menor que quando em seu estado nativo.

Com relação à fração LIP, observou-se pela Figura 10 que o teor de aminoácidos liberados da fração desnaturada foi semelhante ao teor liberado da fração em seu estado nativo, durante

as 3 horas de proteólise pela pepsina.

Concluiu-se que o fenômeno pode ser consequência da ação residual de inibidores de proteases parcialmente resistentes ao tratamento térmico, fato também observado por outros autores com relação à digestão de algumas proteínas de feijão particularmente ricas nestes inibidores (21,175) e, concomitantemente, da formação de agregados não-protéicos de alto peso molecular que dificultariam o acesso da pepsina aos sítios específicos de hidrólise, favorecida pelo elevado teor de carboidratos da fração e induzida pelo tratamento térmico (45,113). Neste caso, a ação da pepsina foi mais comprometida que a ação da pancreatina, com consequências negativas sobre o total de aminoácidos liberados ao final das seis horas de digestão da fração autoclavada (Quadros 18 e 19). Com efeito, as proteínas da fração LIP apresentaram a menor digestibilidade dentre as frações isoladas do feijão "IAC-Carioca 80 SH" (Quadro 16).

A solubilidade das glutelinas no meio ácido de reação é muito reduzida, tanto em seu estado nativo, quanto após desnaturadas pelo calor. Consequentemente, o acesso da pepsina aos sítios específicos da molécula, nos primeiros momentos da digestão, parece estar dificultado pela compactação característica destas proteínas, observada com a fração crua ou autoclavada, no meio ácido da reação. Somente quando as condições do meio se tornam alcalinas, estas proteínas se solubilizam completamente, facilitando a ação da pancreatina. Com efeito, após desnaturação, a digestibilidade das glutelinas foi 38% maior que quando em seu estado nativo, indicando que o tratamento térmico facilitou consideravelmente sua digestão pela pancreatina (quadros 18 e 19 e Figura 11).

A liberação de metionina ao longo da proteólise das frações globulinas, albuminas e globulina G1, cruas ou desnaturadas, apresentou correlações elevadas com o grau de hidrólise destas proteínas (Quadro 21) e foi significativamente maior nas frações desnaturadas pelo calor, o que facilitou tanto a ação da pepsina, quanto a da pancreatina (Quadros 20 e 21 e Figuras 7 a 9).

Com relação à fração LIP, observou-se que a liberação de metionina da fração desnaturada pela pepsina foi significativamente menor que quando em seu estado nativo, ao longo das primeiras 3 horas de digestão (Quadros 20 e 21 e Figura 10).

É possível que regiões específicas das cadeias polipeptídicas onde, provavelmente, estariam concentrados os resíduos de metionina potencialmente biodisponível, tenham se tornado mais inacessíveis ao ataque enzimático pela pepsina em consequência do tratamento térmico. Entretanto, a quimotripsina e as carboxipeptidases, contidas na pancreatina, foram capazes de compensar eficientemente esta redução na liberação do aminoácido sulfurado das proteínas desnaturadas, constatada nas primeiras 3h de digestão. O percentual de metionina potencialmente biodisponível, liberado após as 6h de proteólise, foi aproximadamente 68% maior após o tratamento térmico (Figura 7).

Ao contrario, a liberação de metionina das glutelinas cruas e desnaturadas não diferiu significativamente ao final das 6h de proteólise. Se por um lado, menos metionina foi liberada da fração desnaturada por ação da pepsina, por outro, um aumento proporcional na liberação de metionina pela pancreatina parece ter compensado o efeito negativo do tratamento térmico sobre a

atividade da pepsina (Quadros 20 e 21 e Figura 11).

A constatação de que a liberação de metionina potencialmente biodisponível das glutelinas, desnaturadas ou em seu estado nativo, foi semelhante tanto com relação à ação da pepsina, quanto à da pancreatina, ao contrário das outras frações, parece reforçar as suposições levantadas no item 5.2.5. A extração destas proteínas em meio alcalino pode ter induzido à racemização parcial de resíduos de metionina, resultando na formação de D-isômeros, não acessíveis ao ataque enzimático, quer pela pepsina, quer pela pancreatina (81,89), e que como tal permaneceriam, mesmo após autoclavagem da fração. Consequentemente, reforçaram-se as convicções de que o teor de metionina potencialmente biodisponível das glutelinas pode ser maior do que o estimado neste estudo.

5.2.7 - *Índices de qualidade protéica das frações determinados in vitro.*

A utilização de índices calculados a partir da composição aminoacídica, corrigidos pela digestibilidade e/ou pela biodisponibilidade dos aminoácidos limitantes, é indicada atualmente pelo " *FAO/WHO Codex Committee on Vegetable Proteins*" (CCVP) como a maneira mais adequada de se avaliar a qualidade protéica de proteínas alimentares (75,77). Empregada por vários autores há algum tempo, com diferentes enfoques relativos à escolha dos índices, vem apresentando resultados satisfatórios (10,18,32,57,90,110,128,150,160, 163,164,167,210,211).

Para o cálculo do VB das diferentes frações protéicas, optou-se pelo Índice de Aminoácidos Essenciais de Oser, modificado por Mitchell ("*MEAA index*"), descrito por SHEFFNER (189), o qual afirma que o método apresenta excelente correlação ($r=0,948$) com o valor biológico verdadeiro, determinado em 48 proteínas alimentares a partir de ensaios com ratos, porcos e cães em crescimento. Da mesma forma, BODWELL (17) confirma que o método se correlaciona bem com métodos *in vivo* e, dentre outros testados pelo autor, foi o que apresentou menor tendência em subestimar os valores determinados *in vivo*. O "*MEAA index*" foi denominado neste estudo como "valor biológico calculado" (VB-C).

Com base nas recentes recomendações do CCVP (77), decidiu-se pela realização de pequenas adaptações no cálculo do VB-C, corrigindo o escore aminoacídico dos aminoácidos sulfurados, limitantes nas proteínas de feijões, de acordo com sua biodisponibilidade. Desta forma, os valores de metionina utilizados foram os resultantes da determinação de metionina biodisponível. Em relação à cisteína, fatores incontrolláveis implicaram na impossibilidade de determinar seus percentuais de biodisponibilidade nas frações protéicas.

Se por um lado, reconheceu-se que a biodisponibilidade da cisteína pode variar entre as frações cruas ou autoclavadas, por outro observou-se que, com excessão das albuminas, o teor do aminoácido nas demais frações foi reduzido nas frações cruas e nulo nas autoclavadas (Quadros 14 e 15). Representou, portanto, uma contribuição muito pequena, em termos absolutos, ao total de aminoácidos sulfurados empregado no cálculo do VB-C.

Não corrigir o teor de cisteína total, ou corrigi-lo apenas pela digestibilidade da fração, não foi considerada a opção mais adequada, uma vez que estudos recentes têm demonstrado que a "digestibilidade verdadeira" deste aminoácido nas proteínas de feijões é sempre inferior à digestibilidade de suas proteínas (18,57, 128,163,171).

Decidiu-se, portanto, por efetuar a correção do teor de cisteína total de cada fração, inclusive das albuminas, por um percentual médio de cisteína biodisponível previamente determinado em feijões. O fator escolhido foi 0,44, que corresponde ao centésimo do percentual médio de cisteína "reativa" de seis variedades de feijão cozido determinados recentemente por MARLETTA *et al.* (128), bastante próximo e intermediário aos valores percentuais de cisteína biodisponível em feijões enlatados (46%) ou autoclavados (41%), determinados respectivamente por EGGUM *et al.* (57) e EVANS & BAUER (64) a partir de ensaios com ratos.

Segundo PELLET & YOUNG (152), os escores aminoacídicos devem ser comparáveis à fração de nitrogênio absorvido e efetivamente retido no organismo, ou seja, ao valor biológico (VB). Afirmam que, particularmente nos produtos de origem vegetal, é possível obter uma estimativa da utilização líquida da proteína (NPU), fração do nitrogênio ingerido que é retida pelo organismo, multiplicando-se o VB calculado a partir do escore aminoacídico pela digestibilidade. Segundo estes autores, a correlação com valores determinados *in vivo* é significativa.

Assim, o produto da digestibilidade *in vitro* das frações protéicas isoladas do "IAC-Carioca 80 SH" pelo VB-C correspondente, foi empregado para estimar a utilização líquida protéica de cada

uma delas, denominada neste estudo "coeficiente de utilização protéica líquida calculado" (NPU-C).

Para que os índices adotados se constituam em alternativa válida em relação aos ensaios biológicos, faz-se necessário que se correlacionem bem com os valores correspondentes determinados *in vivo* (75,77,128,152,164,189,206). Assim, o VB-C e o NPU-C foram determinados inicialmente na farinha de feijão integral autoclavado, e comparados com os índices de VB e NPU determinados na mesma farinha a partir de ensaios *in vivo*. Os resultados mostraram não haver diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores determinados nos ensaios *in vitro* (Quadros 23 e 24) e *in vivo* (Quadro 4).

Conclui-se, portanto, que a metodologia adotada para estimar a qualidade protéica atende aos objetivos iniciais. Permite avaliar a qualidade protéica das frações de forma simples, sem utilizar grandes quantidades de amostra, além de se correlacionar bem com valores determinados *in vivo*.

Por outro lado, concluiu-se que os procedimentos adotados para a determinação da composição aminoacídica e, principalmente, da digestibilidade *in vitro* e da metionina biodisponível, mostraram-se adequados para os propósitos desta pesquisa, uma vez que provavelmente não seriam obtidas correlações tão satisfatórias do VB-C e do NPU-C com os índices correspondentes determinados *in vivo*, caso aqueles métodos não exprimissem igualmente bem os resultados observados *in vivo*.

Não se observou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o VB-C das frações cruas e autoclavadas, indicando que o tratamento térmico não afetou a composição aminoacídica das frações de modo a

comprometer sua qualidade. Ao contrário, o NPU-C das frações autoclavadas foi maior que nas frações cruas, refletindo a influência do tratamento térmico, que aumentou a digestibilidade destas proteínas e, conseqüentemente, sua utilização.

Em relação à fração LIP, constatou-se que o VB-C da fração autoclavada foi 6% menor que o da fração crua, em termos absolutos, sugerindo que o tratamento térmico pode ter resultado em algum comprometimento de sua composição aminoacídica, como discutido nos itens 5.2.3 e 5.2.5, ainda que em extensão insuficiente para resultar em redução significativa no valor biológico das proteínas da fração autoclavada.

As frações glutelinas e albuminas, cruas ou autoclavadas, apresentaram melhor valor biológico que as demais frações, refletindo a relativa qualidade da composição aminoacídica destas frações.

A principal proteína do feijão, a Globulina G1 confirmou observações anteriores acerca de sua limitação em aminoácidos essenciais, particularmente aminoácidos sulfurados totais, triptofano, lisina e treonina. Seu valor biológico, em termos absolutos, é o menor dentre todas as frações. As globulinas da fração GLO, menos deficientes em aminoácidos essenciais que a G1, apresentaram um valor biológico intermediário. As lectinas e os inibidores de proteases apresentaram um VB-C equivalente ao VB-C da G1, ainda que, em termos absolutos, o valor biológico da globulina G1 tenha sido inferior ao das lectinas e inibidores de enzimas digestivas.

Com relação aos resultados obtidos na determinação da utilização líquida das proteínas das frações isoladas, constatou-se

que o baixo valor nutritivo da Globulina G1, somente comparável ao da fração LIP, deve contribuir decisivamente para que as proteínas do feijão não apresentem uma qualidade protéica satisfatória, em consequência de constituírem mais de 1/3 das proteínas totais encontradas nos grãos.

As albuminas e globulinas autoclavadas apresentaram uma utilização intermediária, com qualidade protéica semelhante à da farinha de feijão integral autoclavado ($p < 0,05$).

A utilização líquida das proteínas contidas na fração glutelinas foi elevada. Superou a utilização das proteínas das demais frações e também das proteínas da farinha integral do feijão autoclavado. Por sua riqueza em lisina, as glutelinas apresentam um potencial superior ao de outras proteínas vegetais com relação à complementação das proteínas dos cereais; o aumento da qualidade protéica da combinação alimentar cereais/leguminosas tem grande importância nutricional, particularmente no Brasil, onde a mistura "arroz com feijão" constitui a base da alimentação diária da população.

Já foram discutidas anteriormente as suposições de que as glutelinas provavelmente contém mais metionina potencialmente biodisponível do que mostraram os resultados dessa pesquisa (ítems 5.2.5 e 5.2.6). Também com relação ao teor de cisteína das glutelinas há razões para suspeitar de que seja maior do que o determinado experimentalmente. O teor do aminoácido nestas proteínas pode ter sido parcialmente reduzido por ação do pH alcalino durante a extração das proteínas e, portanto, quando elas ainda não estavam desnaturadas (35,40,81,89), ou ainda, após autoclavagem da fração (65,66,187, 200). Caso estas proteínas

não tivessem sofrido um tratamento alcalino durante sua extração dos grãos de feijões, os teores de AST seriam certamente mais elevados, elevando concomitantemente seu valor biológico. Os resultados sobre a utilização protéica verdadeira das glutelinas podem, portanto, estar subestimados e, conseqüentemente, estas proteínas poderão apresentar uma utilização protéica superior ao de outras proteínas de leguminosas, equivalente ao de proteínas de origem animal de qualidade reconhecida.

Neste sentido, é preciso considerar que a interpretação dos resultados da avaliação da qualidade nutricional das glutelinas por ensaios biológicos, que geralmente utilizam estas proteínas como única fonte protéica da dieta dos animais (63,115), deve levar em consideração que a extração das glutelinas por soluções alcalinas, pode resultar em redução da biodisponibilidade de seus aminoácidos sulfurados e de outros aminoácidos essenciais, implicando em redução da utilização de suas proteínas (35,40,81,89,117). Conseqüentemente, a comparação dos índices de qualidade protéica determinados *in vivo* para as glutelinas com proteínas que não sofreram tratamento alcalino, não seria um procedimento adequado, devendo, portanto, ser interpretada com reservas.

A análise dos resultados acerca da utilização líquida das proteínas das frações isoladas confirmou suposições de que a qualidade nutritiva das proteínas da farinha de feijão integral autoclavado parece representar um equilíbrio entre a qualidade nutritiva das proteínas de suas frações isoladas e de que a proporção das diversas proteínas contidas nos grãos irá determinar a composição aminoacídica e a qualidade nutritiva das proteínas

totais presentes no feijão (104).

De um lado, representando 23% das proteínas totais, tem-se as glutelinas, apresentando qualidade superior à da farinha. De outro, as frações G1 e LIP, constituindo em torno de 51% das proteínas do feijão, e apresentando um NPU inferior. Em um nível intermediário, encontram-se as globulinas e albuminas, constituindo aproximadamente 1/4 das proteínas totais e apresentando qualidade nutritiva equiparável à das proteínas da FIA.

5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

JOHNSON & LAY (104) denunciam que a pesquisa para aumentar a qualidade nutricional das leguminosas tem sido negligenciada, apesar das Nações Unidas, através do "*Protein Advisory Group*", ter aconselhado urgência e prioridade para o financiamento de pesquisas relacionadas com o melhoramento genético dos feijões comuns, visando o desenvolvimento de variedades com maior teor de proteínas, aminoácidos sulfurados e melhor digestibilidade (104).

HOSFIELD (93) relata que têm sido encontradas diversas variantes nos feijões que permitem aumentar ou diminuir a quantidade de proteínas específicas nos grãos, e que muitas das frações protéicas da leguminosa estão sob controle genético simples, facilitando a obtenção de novas variedades com as características desejadas. Comenta que a Globulina G1, de baixo valor nutritivo, é a proteína predominante nos grãos e que quaisquer alterações que resultem em modificação na quantidade

relativa desta proteína, nos feijões, têm importância nutricional.

Neste sentido, os resultados desta pesquisa com relação à qualidade nutricional revelada pelas glutelinas, sugerem que o desenvolvimento de variedades contendo menos Globulina G1 e com teores proporcionalmente mais elevados de glutelinas, pode resultar em uma melhora significativa na qualidade nutritiva dos feijões, beneficiando grandes parcelas da população mundial, em sua maior parte constituída por indivíduos de baixo padrão aquisitivo, para quem a leguminosa representa o principal fornecedor de proteínas na alimentação diária.

VI - CONCLUSOES

1) A utilização de hidrólise alcalina seguida de determinação colorimétrica de metionina no hidrolisado pela Cloramina-T, parece ser um procedimento adequado para a determinação da quantidade de metionina total não oxidada presente nos feijões e em suas proteínas isoladas. Da mesma forma, a quantificação da metionina potencialmente biodisponível por hidrólise pelo sistema pepsina/pancreatina, seguida de determinação colorimétrica com a Cloramina-T da metionina não-oxidada presente no hidrolisado enzimático, correlacionou-se bem com valores observados *in vivo*, como também com resultados obtidos por outros métodos de determinação de metionina não-oxidada *in vitro*. Sugere-se que o método do ác. perfórmico seja reavaliado em relação à sua adequação para a determinação de metionina em feijões, e que o conceito de metionina "total" atribuído a seus resultados seja rediscutido e, caso necessário, revisto.

2) Pode-se confirmar que o cultivar "IAC-Carioca 80 SH" possui excelente valor protéico e apresenta quantidades elevadas de metionina disponível, quando comparado a outros cultivares. O teor protéico encontra-se dentro dos valores médios observados para diversas variedades de feijões, mas a digestibilidade foi superior à constatada para outros cultivares brasileiros. Consequentemente, suas proteínas possuem valor biológico e utilização protéica

líquida nitidamente superiores aos valores médios compilados por vários autores e registrados na literatura. Observou-se também que o valor nutritivo de suas proteínas não é inferior ao das proteínas do cultivar a partir do qual este foi desenvolvido e, confirmando portanto, suposições anteriores acerca da excelência do valor biológico e qualidade nutricional das proteínas da linhagem desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas.

3) Dentre as frações isoladas do cultivar "IAC-Carioca 80 SH", as glutelinas foram as proteínas mais ricas em metionina e lisina, enquanto as albuminas apresentaram teores mais elevados de cisteína e triptofano. As globulinas, que constituem mais da metade das proteínas totais dos grãos, apresentaram uma composição aminoacídica limitada, deficiente em aminoácidos sulfurados e triptofano. O tratamento térmico resultou em aumento da digestibilidade de todas as frações. As glutelinas e globulinas desnaturadas apresentaram melhor digestibilidade, ao contrário das lectinas e inibidores, que foram menos digeridas que as outras proteínas dos grãos.

4) Considerando-se as quantidades relativas de cada fração nos grãos e seu conteúdo de metionina potencialmente biodisponível, concluiu-se que as glutelinas, que constituem aproximadamente 23% das proteínas totais nos grãos, fornecem mais metionina biodisponível que as demais, e que este valor pode ser ainda maior que o determinado nos experimentos. A globulina G1, em consequência

de representar aproximadamente 38% do total das proteínas extraídas, fornecem quase tanta metionina biodisponível quanto as glutelinas. Em termos percentuais, constatou-se que o tratamento térmico aumentou a liberação de metionina potencialmente biodisponível de todas as frações, à exceção das glutelinas.

5) A liberação de metionina, em geral, acompanhou o curso da hidrólise, tanto nas frações cruas quanto autoclavadas. O tratamento térmico resultou em aumento na liberação de metionina das frações, à exceção das glutelinas. Estas proteínas apresentaram um comportamento singular, quando comparadas às demais, pois ao longo de toda a digestão, a liberação de metionina foi constante e não diferiu entre as proteínas cruas ou tratadas termicamente, provavelmente em consequência de interações induzidas pelas condições alcalinas presentes em seu processo de extração.

6) As glutelinas apresentaram melhor valor biológico e utilização protéica que as demais frações, superando inclusive a farinha integral do feijão autoclavado, enquanto a globulina G1 e as lectinas e inibidores de proteases foram as proteínas que apresentaram valor nutricional mais reduzido. O desenvolvimento de variedades com maior teor de glutelinas e menor teor de Globulina G1 poderá resultar em feijões com proteínas de valor protéico superior, contribuindo para melhorar a qualidade protéica e o valor nutritivo da alimentação básica das camadas menos favorecidas da população.

VII- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27: 1256-1262, 1979.
- (2) ADLER-NISSEN, J. *Enzymic hydrolisis of food proteins*. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1986, p.16.
- (3) AKESON, W.R. & STAHPMAN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *Journal of Nutrition* 83: 257-261, 1964.
- (4) AL, T.L. & SWANSON, B.G. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. *Journal of Food Science* 50: 67-71, 1985.
- (5) ALLREDD, M.C. & Mac DONALD, J.L. Determination of sulfur aminoacids and tryptophan in foods and food and feed ingredients: collaborative study. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists* 71: 603-606, 1988.
- (6) ANDERSON, G.H.; ASHLEY, D.V.M. & JANES, J.D. Utilization of L-methionine sulfoxide, L-methionine sulfone and cisteic acid by the weanling rat. *The Journal of Nutrition* 106: 1108-1115, 1976.
- (7) ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V.C. Influence of time and conditions of storage on technological and nutrition properties of a dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) variety Rosinha G2. *Journal of Food Science* 44: 1703-1706, 1979.
- (8) APOSTOLATOS, G. & HOFF, J.E. An improved method for the chromatographic determination of methione in proteins and crude plant materials. *Analytical Biochemistry* 118: 126-130, 1981.
- (9) APOSTOLATOS, G. Protein isolates rich in methionine from the edible dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Food Technology* 19: 233-237, 1984.
- (10) ARAYA, H. & PAK, L. Análisis de los criterios metodológicos recomendados por FAO-OMS 1973 para calcular los niveles seguros de ingesta según calidad de la proteína dietaria. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 28: 63-74, 1978.
- (11) AYKROID, W.K. & DOUGHTY, J. *Legumes in human nutrition*. FAO Nutrition Studies 19, Roma, 1964.
- (12) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 12 ed. HORWITZ, W.(org.), Washington, 1975.

- (13) BADIALE, E. *Variação de metionina em feijões armazenados (Phaseolus vulgaris, L.)*. Campinas, 1979. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- (14) BATHY, R.S. Albumin proteins of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and amino-acid acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 620-622, 1982.
- (15) BENDER, F.E.; DOUGLAS, L.W. & KRAMER, A. *Statistical methods for food and agriculture*. Westport, Avi Publishing Company Inc., 1982, p.91-94.
- (16) BLANCO, A.; NAVARETTE, D.A.; BRESSANI, R.; BRAHAN, J.E.; BRENES, R. & ELIAS, G. Composición química y evaluación de la calidad de la proteína del frijol en humanos adultos por el método del balance nitrogenado de corto tiempo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 36:79-97, 1986.
- (17) BODWELL, C.E. Amino acid content as an estimate of protein quality for humans. In: FINLEY, J. W. & HOPKINS, D.T. (org.) *Digestibility and amino acid availability in Cereals and Oilseeds*. Saint Paul, Am. Assoc. Cereals Chem. Inc., 1985, p. 1-14.
- (18) BODWELL, C.E.; CARPENTER, K.J. & McDONOUGH, F.E. A collaborative study of methods of protein evaluation : introductory paper. *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 3-12, 1989.
- (19) BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M.J. Characterization and sub-cellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 142: 291-299, 1978.
- (20) BOS, K.D; VERBEEK, C. & SLUMP, P. A gas-liquid chromatographic method for the analysis of methionine and of methionine sulphoxide in proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31: 63-66, 1983.
- (21) BRADBEEAR, N. & BOULTER, D. The use of enzymatic hydrolysis *in vitro* to study the digestibility of some *Phaseolus* seed proteins. *Plant Foods for Human Nutrition* 34: 3-13, 1984.
- (22) BRENES, R.G.; ELIAS, L.G.; MOLINA, M.R.; DE LA FUENTE, G. & BRESSANI, R. Changes in chemical composition and nutritive value of common beans and other legumes during house-cooking. In: JAFFE, W.G. (org.) *Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods*. Caracas, Ed. Excelsior, 1973, p.93-108.
- (23) BRESSANI, R. Factors that determine the nutritional value of dried beans. Research needs. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry,*

nutrition, technology. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 1.

- (24) BRESSANI, R.; HERNANDEZ, E.; NAVARETTE, D. & BRAHAM, J.E. Protein digestibility of methionine supplemented common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) in adult human subjects. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 34: 640-653, 1984.
- (25) BRESSANI, R.; HERNANDEZ, E. & BRAHAN, J.E. Relationship between content and intake of bean polyphenolics and protein digestibility in humans. *Plant Foods for Human Nutrition* 38: 5-21, 1988.
- (26) BROT, N. & WEISSBACH, H. Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 223: 271-281, 1983.
- (27) BURR, H.K. Effect of storage on cooking qualities, processing and nutritive value of beans. In: JAFFE, W.G. (org.) *Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods.* Caracas, Ed. Excelsior, 1973, pp 81-91.
- (28) CARBONARO, M.; MARLETTA, L. & CARNOVALE, E. Factors affecting cystine reactivity in proteolytic digests of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40: 169-173, 1992.
- (29) CHANG, K.C.; KENDRICK, J.G.; MARSHALL, H.F. & SATTERLEE, L.D. Effect of partial methionine oxidation on the nutritional quality of soy isolate and casein. *Journal of Food Science* 50: 849-850, 1985.
- (30) COHEN, S.A. & STRYDOM, D.J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. *Analytical Biochemistry* 174: 1-16, 1988.
- (31) CONCON, J. Chemical determination of critical amino-acids in cereal grains and other foodstuffs. In: FRIEDMAN, M. (org.) *Protein nutritional quality of foods and feeds.* New York, Ed. Marcel Dekker, 1975, v.1, p. 311-379.
- (32) CORREA, A.D; JOKL, L & CARLSSON, R. Amino acid composition of some *Amaranthus sp.* grain proteins and of its fractions. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 36: 466-476, 1986.
- (33) CUQ, J.L.; GUILLEUX, F. & CHEFTEL, C. Oxidation of methionine residues of casein by hydrogen peroxide. Effects on *in vitro* digestibility. *Journal of Food Science* 38: 11-13, 1973.
- (34) DE ANGELIS, R.C. & OROZCO, G.A. Bioavailability in humans of selected nutrients from rice and bean diets. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean*

research. *Chemistry, nutrition, technology*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 44-49.

- (35) DE GROOT, A.P. & SLUMP, P. Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *The Journal of Nutrition* 98: 45-56, 1969.
- (36) DE LUMEN, B.O. & KHO, C.J. Identification of methionine-containing proteins and quantitation of their methionine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 686-691, 1987.
- (37) DE MORAES, R.M. & ANGELUCCI, E. Chemical composition and amino acid content of brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*) *Journal of Food Science* 36: 493-494, 1971.
- (38) DE OLIVEIRA, A.C.; SAWAZAKI, H.E. & GALEAZZI, M.A.M. Extração, caracterização parcial e aspectos nutricionais do feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47: 88-100, 1987.
- (39) DE OLIVEIRA, J.E.D. Studies on the nutritive value of common beans. In: JAFFE, W.G. (org.) *Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods*. Caracas, Ed. Excelsior, 1973, pp 1-23.
- (40) DE RHAM, O.; VAN DE ROVAART, P.; BUJARD, E.; MOTTU, F. & HILDALGO, J. Fortification of soy protein with cheese whey protein and the effect of alkaline pH. *Cereal Chemistry* 54: 238-245, 1977.
- (41) DEPARTAMENTO DE EXTENSÃO RURAL (DEXTRU). *Feijoeiro: Carioca 80 (sem halo)*. São Paulo, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, Comunicado Técnico 74, 1988.
- (42) DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. Review: legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-24, 1976.
- (43) DESHPANDE, S.S. & DAMODARAN, S. Conformational characteristics of legume 7S globulins as revealed by circular dichroic, derivative U.V. absorption and fluorescence techniques. *International Journal of Peptide Research* 35: 25-38, 1990.
- (44) DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. *In vitro* enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris*, L. *Journal of Food Science* 52: 1326-1329, 1987.
- (45) DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. *In vitro* digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) proteins: the role of heat stable protease inhibitors. *Journal of Food Science* 52: 1330-1334, 1987.
- (46) DIECKERT, J.F. The chemistry and cell biology of vacuolar

protein of seeds. **Journal of Food Science** 41: 475-482, 1976.

- (47) DOMENE, S.M.A. *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. Campinas, 1990. Tese de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- (48) DONOSO, G.; LEWIS, O.A.M.; MILLER, D.S. & PAYNE, P.R. Effect of heat treatment on the nutritive value of proteins: chemical and balance studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 13:192-196, 1962.
- (49) DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28: 350-356, 1956.
- (50) DUNCAN, A.; McINTOSH, A. & ELLINGER, G.M. Determination of methionine in the seeds of legumes. **The Proceedings of the Nutrition Society** 35: 148A-149A, 1976.
- (51) DUNCAN, A.; ELLINGER, G.M. & GLENNIE, R.T. Determination of unmodified methionine and methionine sulfoxide in food proteins by gas-liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 35: 117-120, 1984.
- (52) DUNCAN, A.; ELLINGER, G.M. & GLENNIE, R.T. Determination of methionine by gas-liquid chromatography: modifications in its applications to legumes and cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 35: 381-384, 1984.
- (53) DUNCAN, D.B. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics** 11: 1-42, 1955.
- (54) DURIGAN, J.F. *Influência do tempo e das condições de estocagem sobre as propriedades químicas e físico-mecânicas e nutricionais do feijão mulatinho (P. vulgaris, L.)*. Campinas, 1979. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- (55) DURIGAN, J.F. *Estudo da toxidez, composição e valor nutritivo de cultivares brasileiros de feijão (Phaseolus vulgaris, L.)*. Campinas, 1985. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- (56) DURIGAN, J.F.; SGARBIERI, V.C. & BULISANI, E. Protein value of dry bean cultivars: factors interfering with biological utilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 35: 694-698, 1987.
- (57) EGGUM, B.O.; HANSEN, I. & LARSEN T. Protein quality and

- digestible energy of selected foods determined in balance trials with rats. **Plant Foods for Human Nutrition** 39: 13-21, 1989.
- (58) ELLINGER, G.M. & PALMER, R. The biological availability of methionine sulfoxide. **Proceedings of the Nutrition Nutrition Society** 28: 42A, 1969.
- (59) ELLINGER, G.M. & DUNCAN, A. The determination of methionine in proteins by gas-liquid chromatography. **Biochemical Journal** 155: 615-621, 1976.
- (60) ELLINGER, G.M.. A chemical approach to the nutritional availability of methionine in food proteins. **Annales de Nutrition et Alimentation** 32: 281-289, 1978.
- (61) ERICSON, M.C. & DELMER, D.P. Glycoprotein synthesis in plants. III- Interaction between UDP-N-acetyl glucosamine and GDP-mannose as substrates. **Plant Physiology** 61: 819-823, 1978.
- (62) EVANS, I.M.; FORD, J.E.; HANNAH, L.C. & BOULTER, D. Comparison of chemical and microbiological methods in the estimation of methionine in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **The British Journal of Nutrition** 36: 289-293, 1976.
- (63) EVANS, R.J.; BAUER, D.H.; SISAK, K.A. & RYAN, P.A. The availability for the rat of methionine and cystine contained in heated dry bean seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 22: 130-133, 1974.
- (64) EVANS, R.J. & BAUER, D.H. Studies on the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 26: 779-784, 1978.
- (65) EVANS, R.J. & BUTTS, H.A. Inactivation of aminoacids by autoclaving. **Science** 109: 569-571, 1949.
- (66) FIGUEIROA, M.O.R.; MANCINI FILHO, J., & LAJOLO, F.M. Ação anti-nutricional das fito-hemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*, L. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición** 34: 488-499, 1984.
- (67) FINARDI FILHO, F. & LAJOLO, F.M. Isolation and characterization of the amylase inhibitor of the black bean (*Phaseolus vulgaris*). In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry, nutrition, technology*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 205-214.
- (68) FINLAYSON, A.J. & MacKENZIE, S.L. A rapid method for methionine determination in plant materials. **Analytical Biochemistry** 70: 397-402, 1976.

- (69) FINLEY, J.W. Reducing variability in aminoacid analysis. In: FINLEY, J.W. & HOPKINS, D.T. (org.) *Digestibility and aminoacid availability in cereals and oil seeds*. Saint-Paul, Am. Assoc. Cereal Chem. Inc., 1985, p.15-30.
- (70) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Protein requirements. Report of a joint FAO/WHO expert group. **Technical Report Series 301**, 1965.
- (71) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Food balance sheets 1960-1962*. Roma, FAO, 1966.
- (72) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Aminoacid content content of foods and biological data on proteins. **Fao Nutritional Studies 24**, 1970.
- (73) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Energy and protein requirements. **Technical Report Series 522**, 1973.
- (74) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Necesidades de Energia e Proteinas. Recomendaciones de una Reunión Oficial FAO/WHO de Expertos. *Alimentación y Nutrición* 1: 12, 1975.
- (75) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Codex Alimentarius Comission Document. Alinorm 85- 30 Working Group's Report to the Third Session Session of Codex Committee on Vegetable Proteins (CCVP) on Methods for Evaluating Protein Quality*. Roma, FAO, 1984.
- (76) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *FAO production yearbook*. 1986. **Statistic series 76**, 1987.
- (77) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Codex Alimentarius Comission Document. Alinorms CX/VP 89/4 Working Group's Report to the Fifth Session of Codex Committee on Vegetable Proteins (CCVP) on Methods for Evaluating Protein Quality*. Ottawa, FAO, 1989.
- (78) FORD, J.E. & SALTER, D.N. Analysis of enzymically digested food proteins by Sephadex-Gel filtration. **The British Journal of Nutrition** 20: 843-860, 1966.
- (79) FORD, J.E. & SHORROCK, C. Metabolism of heat-damaged protein in the rat. Influence of heat damage on the excretion of amino acids and peptides in the urine. **The British Journal of Nutrition** 26: 311-318, 1971.
- (80) FRIEDMAN, M. & NOMA, A.T. Methods and problems on chromatographic analysis of sulfur amino acids. In: FRIEDMAN, M. (org.) *Protein nutritional quality of foods and feeds*. New York, Ed. Marcel Dekker, 1975, v.1, p. 521-547.
- (81) FRIEDMAN, M.; ZAHNLEY, J.C. & MASTERS, P.M. Relationship between *in vitro* digestibility of casein and it's content of lysinoalanine and D-aminoacids. **Journal of Food**

Science 46: 127-134, 1981.

- (82) GALEAZZI, M.A.M. *Métodos experimentais em proteínas*. Manual de Laboratório, em fase de publicação, 1992.
- (83) GAUTHIER, S.F.; VACHON, C.; JONES, J.D. & LAURENT, S. Assesment of protein digestibility by *in vitro* enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis. *The Journal of Nutrition* 112: 1718-1725, 1982.
- (84) GEERVANI, P. & THEOPHILUS, F. Influence of legume starches on protein utilization and availability of lysine and methionine to albino rats. *Journal of Food Science* 46: 817-818, 1981.
- (85) GEHRKE, C.W. & NEUNER, T.E. Automated chemical determination of methionine. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists* 57: 682-688, 1974.
- (86) GEORGE, A.A.; DE LUMEN, B.O.; WHITAKER, J.R. & SGARBIERI, V.C. Methionine-containing proteins in two *Phaseolus vulgaris* cultivars with different methionine bioavailabilities. *Plant Foods for Human Nutrition*, aceito para publicação, 1992.
- (87) GRANT, G.; DE OLIVEIRA, J.T.A. & PUZTAI, A. Toxicity of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry, nutrition, technology*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 81-100.
- (88) HALL, T.C.; McCLEESTER, R.C. & BLISS, S.A. Equal expression of the maternal and paternal alleles for the polypeptide subunits of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris*, L. *Plant Physiology* 59: 1122-1124, 1977.
- (89) HAYASHI, R. & KAMEDA, I. Decreased proteolysis of alkali treated proteins: consequences of racemization in food processing. *Journal of Food Science* 45: 1430-1431, 1980.
- (90) HAYASHI, R. & SUZUKI, F. Determination of methionine sulfoxide in protein and food by hydrolysis with p-toluenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry* 149: 521-528, 1985.
- (91) HEINRIKSON, R.L. & MEREDITH, S.C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: pre-column derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry* 136: 65-74, 1984.
- (92) HERNANDEZ, M.; de la VEGA & SOTELO, A. Determinación de la digestibilidad proteínica *in vitro* e *in vivo* en cereales e leguminosas, crudos y cocidos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 34: 513-522, 1984.

- (93) HOSFIELD, G.L. Genetic control of production and food quality factors in dry bean. **Food Technology** 45: 98-103, 1991.
- (94) HUNG, N.D.; VAS, M.; CSEKE, E. & SZABOLCSI, G. Relative tryptic digestion rates of food proteins. **Journal of Food Science** 49: 1535-1542, 1984.
- (95) HUNG, N.D.; CSEKE, E.; VAS, M. & SZABOLCSI, G. Processed protein foods characterized by *in vitro* digestion rates. **Journal of Food Science** 49: 1543-1552, 1984.
- (96) HURRELL, R.F. & FINOT, P.A. Effects of food processing on protein digestibility and amino acid bioavailability. In: FINLEY, J. W. & HOPKINS, D.T. (org.) *Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds*. Saint-Paul, Am. Assoc. Cereals Chem. Inc., 1985, p.1-14.
- (97) JAFFE, W.G. Toxic factors in beans. Their practical importance. In: JAFFE, W.G. (org.) *Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods*. Caracas, Ed. Excelsior, 1973, p.199-209.
- (98) JAFFE, W.G. & BRUCHER, R. El contenido de nitrógeno total y aminoácidos azufrados en diferentes líneas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición** 24: 107-114, 1974.
- (99) JAFFE, W.G. & HANNING, H. Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Archives of Biochemistry and Biophysics** 109: 80-86, 1965.
- (100) JAMMALIAN, J. & PELLET, P.L. Nutritional value of Middle Eastern foodstuffs. Amino acid composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 19: 378-383, 1968.
- (101) JANSEN, G.R. Amino acid supplementation of common beans and other legumes. In: JAFFE, W.G. (org.) *Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods*. Caracas, Ed. Excelsior, 1973, p.217-232.
- (102) JENNINGS, D.M. & LEWIS, O.A.M. Methionine loss during hydrolysis of plant material. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 17: 668-669, 1969.
- (103) JOHNSON, C.R. & WESTRICK, M.P. Sulfoxides. **Methods in Enzymology** 143: 281-286, 1987.
- (104) JOHNSON, V.A. & LAY, C.L. Genetic improvement of plant proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 22: 558-566, 1974.
- (105) JORI, G.; GALIAZZO, G.; MARZOTTO, A. & SCOFFONE, E. Selective and reversible photo-oxidation of the methionyl residues in lysozyme. **The Journal of Biological Chemistry** 243: 4272-4278, 1968.

- (106) JUNQUEIRA, R.G. & SGARBIERI, V.C. Isolation and general properties of lectins from the bean (*Phaseolus vulgaris*, L. var. Rosinha G2). *Journal of Food Biochemistry* 5: 165-179, 1981.
- (107) KAKADE, M.L.; SIMONS, N. & LIENER, I.E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the anti-tryptic activity of soybean samples. *Cereal Chemistry* 46: 518-526, 1969.
- (108) KAN, T. & SHIPE, W.F. Enzyme dialfiltration technique for *in vitro* determination of protein digestibility and availability of amino acids of legumes. *Journal of Food Science* 49: 794-798, 1984.
- (109) KANAMORI, M.; IKEUCHI, T.; IBUKI, F.; KOTARU, M. & KAN, K.K. Amino acid composition of protein fractions extracted from *Phaseolus* beans and the Field beans (*Vicia faba*, L.). *Journal of Food Science* 47: 1991-1994, 1982.
- (110) KENNEDY, J.F.; NOY, R.J.; STEAD, J.A. & WHITE, C.A. A new rapid enzyme digestion method for predicting *in vitro* protein quality (PDD index). *Food Chemistry* 32: 277-295, 1989.
- (111) KUZMICKY, D.D.; KOHLER, G.O.; WALKER Jr., H.G. & MACKEY, B.E. Availability of oxidized sulfur amino acids for the growing chick. *Poultry Science* 53: 1945-1950, 1974.
- (112) LAJOLO, F.M.; FINARDI FILHO, f. & MENEZES, E.W. Amylase inhibitors in *Phaseolus vulgaris* beans. *Food Technology* 45: 119-121, 1991.
- (113) LANFER-MARQUEZ, U.U. & LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumins, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 1068-1074, 1981.
- (114) LANFER-MARQUEZ, U.U. *Digestibilidade e propriedades nutricionais do feijão (Phaseolus vulgaris, L.) e de suas proteínas isoladas*. São Paulo, 1988. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- (115) LANFER-MARQUEZ, U.U. & LAJOLO, F.M. *In vivo digestibility of bean (Phaseolus vulgaris) proteins: the role of endogenous protein*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1211-1215, 1991.
- (116) LANTZ, E.M.; GOUGH, H.W. & CAMPBELL, A.M. Effect of variety, location and years on the protein and amino acid contents of dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 6: 58-62, 1958.
- (117) LIARDON, R. & HURRELL, R.F. Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *Journal of Agricultural*

and Food Chemistry 31: 432-437, 1983.

- (118) LIENER, I.E. Toxic constituents of plant foodstuffs. 2^a ed., New York, Academic Press Inc., 1980.
- (119) LIENER, I.E. The photometric determination of hem-agglutinating activity of soya and crude soybean extracts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 54: 54: 223-231, 1955.
- (120) LIENER, I.E. & THOMPSON, R.M. *In vitro* and *in vivo* studies studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Foods for Human Nutrition* 30: 13-25, 1980.
- (121) LIPTON, S.H. & BODWELL, C.E. Chemical approaches for estimating nutritionally available methionine. In: FRIEDMAN, M. (org.) *Protein nutritional quality of foods and feeds. Part 1. Assay methods- Biological, biochemical and chemical*. New York, Ed. Marcel Dekker, 1975, v.1 v.1, p. 569-576.
- (122) LUNDER, T.L. Determination of methionine sulfoxide content of intact protein based on rearrangement of sulf-oxide with acetic anhydride. *Analytical Biochemistry* 49: 585-588, 1972.
- (123) LUNDER, T.L. An improved method for the determination of methionine in acid hydrolysates of biological products. *Industrie alimentari* 12: 93-100, 1973.
- (124) MA, Y. & BLISS, F.A. Seed proteins of common beans. *Crop Science* 18: 431-442, 1978.
- (125) MacDONALD, J.L; KRUEGER, M.W. & KELLER, J.H. Oxidation and and hydrolisis determination of sulfur aminoacids in food and feed ingredients: collaborative study. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists* 68: 826-829, 1985.
- (126) MacKENZIE, S.L. *In vitro* methods to measure sulfur amino acid availability. In: FINLEY, J. W. & HOPKINS, D.T. (org.) *Digestibility and amino acid availability in Cereals and Oilseeds*. Saint Paul, Am. Assoc. Cereals Chem. Inc., 1985, p. 47-63.
- (127) MacRITCHIE, F. Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. *Advances in Food and Nutrition Research* 36: 1-46, 1992.
- (128) MARLETTA, L.; CARBONARO, M. & CARNOVALE, E. *In vitro* protein and sulfur amino acid availability as a measure of bean protein quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59: 497-504, 1992.
- (129) MAURON, J. Nutritional evaluation of proteins by enzymatic

- methods. In: BENDER, A.E.; KIHLEBERG, R.; LOFQUIST, B. & MUNCK, L. (org.) *Evaluation of novel protein products*. Oxford, Pergamon Press, 1970, p. 211-234.
- (130) McCARTHY, T.E. & SULLIVAN, M.X. A new and highly specific colorimetric test for methionine. *Journal of Biological Chemistry* 141: 871-876, 1941.
- (131) McDONOUGH, F.E.; BODWELL, C.E; STAPLES, R.S. & WELLS, P.A. Rat bioassays for methionine availability in 16 food sources. *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 77-84, 1989.
- (132) MENEZES, E.W. & LAJOLO, F.M. Inhibition of starch digestion by a black bean alpha-amylase inhibitor, in normal and diabetic rats. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry, nutrition, technology*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 216-226.
- (133) MILLER, E.L. & CARPENTER, K.J. Availability of sulphur amino acids in protein foods. 1. Total sulphur amino acid content in relation to sulphur and nitrogen balance studies with the rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 15: 810-820, 1964.
- (134) MILLER, E.L.; CARPENTER, K.J. & MILNER, C.K. Availability of sulfur amino acids. 3. Chemical and nutritional changes in heated cod muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 15: 810-816, 1965
- (135) MILLER, S.D. & BENDER, A.E. Determination of the net utilization of protein by a shortened method. *The British Journal of Nutrition* 9: 382-388, 1955
- (136) MILLER, S.A & SAMUEL, P. Methionine sparing compounds. *Proceedings of the Nutrition Society* 27: 21A, 1968.
- (137) MILLER, S.A & SAMUEL, P. Effects of the addition of sulphur compounds to the diet on the utilization of protein in young rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 21: 616-618, 1970.
- (138) MILLER, S.A.; TANNENBAUM, S.R & SEITZ, A.W. Utilization of L-methionine sulfoxide by the rat. *Journal of Nutrition* 100: 909-916, 1970.
- (139) MITCHELL, H.H. A method of determining the biological value of protein. *Journal of Biological Chemistry* 58: 873-903, 1923/1924.
- (140) MONGEAU, R.; SARWAR, G.; PEACE, R.W. & BRASSARD, R. Relationship between dietary fiber levels and protein digestibility in selected foods as determined in rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 1-12, 1989.
- (141) MOORE, S. On the determination of cysteine as cysteic

- acid. *Journal of Biological Chemistry* 238: 235-237, 1963.
- (142) NEUMAN, N.P. Analysis for methionine sulfoxides. *Methods in Enzymology* 11: 487-490, 1967.
- (143) NEUMAN, C.W.; ROTH, N.J.; NEWMAN, R.K. & LOCKERMAN, R.H. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum*, L.). *Nutrition Reports International* 31: 1-8, 1987.
- (144) NIELSEN, S.S. Digestibility of legume proteins. *Food Technology* 45 (9): 112-118, 1991.
- (145) NIELSEN, S.S.; DESHPANDE, S.S.; HERMODSON, M.A. & SCOTT, M.P. Comparative digestibility of legume storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 896-902, 1988.
- (146) NJAA, L.R. Utilization of methionine sulphoxide and methionine sulphone by the young rat. *The British Journal of Nutrition* 16: 571-580, 1962.
- (147) NJAA, L.R. A method for determination of unoxidized and total methionine in protein concentrates, with special reference to fish meals. *The British Journal of Nutrition* 43: 339-348, 1980.
- (148) Nutritional implications of sulfur amino acid oxidation. *Nutrition Reviews* 31: 220-221, 1973.
- (149) NUTRITION BIOCHEMICALS CORPORATION. *INC diet catalog*. Cleveland, Life Sciences Group, 1977/1978.
- (150) PAK, N.; VERA, G. & ARAYA, H. Evaluación del computo aminoacídico corregido por digestibilidad para estimar la calidad proteínica y la proteína utilizable de alimentos y dietas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 35: 80-89, 1985.
- (151) PEARSON, D. *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*. Zaragoza, Ed. Acribia, 1976, p. 60-62.
- (152) PELLET, P.L. & YOUNG, V.R. *Nutritional Evaluation of Protein Foods. Report of a working group sponsored by the International Union of Nutritional Sciences and the United Nations University World Hunger Programs*. Tokyo, The United Nations University, 1980.
- (153) PERNOLLET, J.C. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry* 17: 1473-1480, 1978.
- (154) PIENIAZEK, D.; GRABAREK, Z. & RAKOWSKA, M. Quantitative determination of the content of available methionine and cysteine in food proteins. *Nutrition and Metabolism* 18: 16-22, 1975.

- (155) PIENIAZEK, D.; RAKOWSKA, M.; SZKILLADZIOWA, W. & GRABAREK, Z. Estimation of available methione and cysteine in proteins of food products by *in vivo* and *in vitro* methods. *The British Journal of Nutrition* 34: 175-190, 1975.
- (156) PIKE, R.L. & BROWN, M.L. *Nutrition: an integrated approach*. New York, John Wiley & Sons Inc., 1967, p. 410.
- (157) PHILLIPS, D.E.; EYRE, M.D.; THOMPSON, A. & BOULTER, D. Protein quality in seed meals of *Phaseolus vulgaris* and heat-stable factors affecting the utilization of proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32: 423-426, 1981.
- (158) POWERS, J.R. & WHITAKER, J.R. Purification and some physical and chemical properties of Red Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitor. *Journal of Food Biochemistry* 1: 217-238, 1977.
- (159) RAY Jr., W.J. & KOSHLAND Jr., D.E. Identification of amino acids involved in phosphoglucomutase action. *The Journal of Biological Chemistry* 237: 2493-2505, 1962.
- (160) RAYAS-DUARTE, L. D.; SATTERLEE, L. D. & ROMERO, A. L. Enzymatic release of peptides, methionine and cystine from dry beans following various heat treatments. *Journal of Food Science* 53: 468-472, 1988.
- (161) REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K. & SALUNKHE, D.K. (org.) *Phytates in Cereals and Legumes*. Boca Raton, CRC Press Inc., 1989.
- (162) ROMERO, J. & RYAN, D.S. Susceptibility of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* to *in vitro* enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 784-788, 1978.
- (163) SARWAR, G.S.; PEACE, R.W.; BOTTING, H.G. & BRULE, D. Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 23-32, 1989.
- (164) SARWAR, G.S.; PEACE, R.W.; BOTTING, H.G. & BRULE, D. Relationship between amino acid scores and protein quality indices based on rat growth. *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 33-44, 1989.
- (165) SATHE, S.K.; DESHPANDE, S.S. & SALUNKHE, D.K. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part I : Chemical composition: proteins. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20: 1-46, 1978.
- (166) SATHE, S.K.; IYER, V. & SALUNKHE, D.K. Functional properties of the Great Northern bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) proteins. *Journal of Food Science* 47: 8-14, 1982.

- (167) SATTERLEE, L.D.; KENDRICK, J.G.; MARSHALL, H.F.; JEWELL, D.K.; ALI, R.A.; HECKMAN, M.M.; STEINKE, H.F.; LARSON, P.; PHILLIPS, R.D.; SARWAR, G. & SLUMP, P. *In vitro* assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 65: 798-809, 1982.
- (168) SAUNDERS, R.M.; CONNOR, M.A.; BOOTH, A.N.; BICKOFF, E.M. & KOHLER, G.O. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. **Journal of Nutrition** 103: 530-542, 1973.
- (169) SAVIGE, W.E. & FONTANA, A. Interconversion of methionine and methionine sulfoxide. **Methods in Enzymology** 47: 453-460, 1977.
- (170) SAVOIE, L. & GAUTHIER, S.F. Dialysis cell for the *in vitro* measurement of protein digestibility. **Journal of Food Science** 51: 494-498, 1986.
- (171) SAVOIE, L.; CHARBONNEAU, R. & PARENT, G. *In vitro* amino acid digestibility of food proteins as measured by the digestion cell technique. **Plant Foods for Human Nutrition** 39: 93-107, 1989.
- (172) SAVOIE, L.; PARENT, G. & GALIBOIS, I. Effects of alkali treatment on the *in-vitro* digestibility of proteins and the release of amino acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 56: 363-372, 1991.
- (173) SCHACHTER, H.; HALLIDAY, K.A & DIXON, G.H. An alteration in the reactivity of chymotrypsin and trypsin towards hydrogen peroxide in the presence of specific substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, 238 (9): 3134-3136, 1963.
- (174) SCHONHAUS, I. *Composição e valor biológico das proteínas de quatro variedades de milho (Zea mays, L.) em dois estágios de maturação*. Campinas, 1980, Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- (175) SEIDL, D.; JAFFE, M. & JAFFE, W.G. Digestibility and proteinase inhibitory action of a kidney bean globulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 17: 1318-1321, 1969.
- (176) SHECHTER, Y.; BURSTEIN, Y. & PATCHORNIK, A. Selective oxidation of methionine residues in proteins. **Biochemistry** 14: 4497-4503, 1975.
- (177) SGARBIERI, V.C. *Propriedades físico-químicas e nutricionais de proteínas de feijão (Phaseolus vulgaris, L.), var. Rosinha G2*. Campinas, 1979. Tese de Livre Docência, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- (178)SGARBIERI, V.C.; ANTUNES,P.L. & ALMEIDA,L.D. Nutritional evaluation of four varieties of dry bean (*Phaseolus vulgaris*,L.). *Journal of Food Science* 44: 1306-1309, 1979.
- (179)SGARBIERI,V.C. Estudo do conteúdo e algumas características das proteínas em sementes de plantas da família *Leguminosae*. *Ciência e Cultura* 32: 78-84, 1980.
- (180)SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L. & JUNQUEIRA,R.G. Algumas propriedades físicoquímicas e nutricionais das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*,L.), var. Rosinha G2. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2: 1-20, 1982.
- (181)SGARBIERI,V.C. & WHITAKER, J.R. Partial characterization of tripsin-chymotrypsin inhibitors from bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) var. Rosinha G2: chemical and physical properties. *Journal of Food Biochemistry* 5: 215-232,1981.
- (182)SGARBIERI, V.C. & WHITAKER, J.R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Advances in Food Research* 28: 93-166, 1982.
- (183)SGARBIERI, V.C.; PUSZTAI, A. & CLARKE, E.M.W. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of undenatured bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 33: 881-891, 1982
- (184)SGARBIERI, V.C.; TEZOTO, S. & DE OLIVEIRA, A.C. *Estudo da composição e do valor nutritivo de um novo cultivar de feijão*. Anais do VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Brasília, 1986, p.81-86.
- (185)SGARBIERI,V.C. *Alimentação e nutrição. Fator de saúde e desenvolvimento*. São Paulo, Almed Ed., 1987, p. 258-260.
- (186)SGARBIERI, V.C.; DURIGAN,J.F. & AMAYA-FARFAN,J. Methods for quantification and evaluation of bioavailability of sulfur aminoacids in dry beans. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry, nutrition,technology*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 22-34.
- (187)SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *World Review of Nutrition and Dietetics* 60: 132-198, 1989.
- (188)SGARBIERI,V.C. & GALEAZZI,M.A.M. Quantification and some chemical and biochemical characterization of nitrogenous substances from varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Food Biochemistry* 14: 233-247, 1990.
- (189)SHEFFNER, A.L. *In vitro* protein evaluation. In: ALBANESE, A.A. (org.) *Newer methods of nutritional biochemistry*.New York, 1967, Academic Press Inc.,v.3, p.125-195.

- (190) SPACKMAN, D.H.; SETTEIN, W.H. & MOORE, S. *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids*. BECKMAN INSTRUMENTS, Palo Alto, 1977.
- (191) STAHMANN, M.A. & WOLDEGIORGIS, G. Enzymatic methods for protein quality determination. In: FRIEDMAN, M. (org.) *Protein nutritional quality of foods and feeds*. New York, 1975, Ed. Marcel Dekker, v.1, p. 211-234.
- (192) SUN, S.M. & HALL, T.C. Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23: 184-189, 1975.
- (193) SUN, S.M.; MUTSCHLER, M.A.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. Protein synthesis and accumulation in beans cotyledons during growth. *Plant Physiology* 61: 918-923, 1978.
- (194) SWAISGOOD, H.E. & CATIGNANI, G.L. Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment. *Advances in Food Research* 35: 185-236, 1991.
- (195) TANDON, O.B.; BRESSANI, R.; SCRIMSHAW, N.S. & LE BEAU, F. Nutrients in Central America beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5: 137-142, 1957.
- (196) TANIZAKI, M.M. & LAJOLO, F.M. Interaction of the amylase inhibitor with alpha-amylase kinetics and effect of chemical modifications of the enzyme. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry, nutrition, technology*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 215.
- (197) TANNENBAUM, S.R.; BARTH, H. & LE ROUX, J.P. Loss of methionine in casein during storage with autoxidizing methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17: 1353-1354, 1969.
- (198) TEZOTO, S.S. & SGARBIERI, V.C. Protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1152-1156, 1990.
- (199) THOMPSON, L.U. & SERRAINO, M.R. Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and amino-acid absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34: 468-474, 1986.
- (200) TOBIN, G. & CARPENTER, K.J. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): a literature review. *Nutritional Abstracts and Reviews - Series A. Human and Experimental* 48: 919-936, 1978.
- (201) TROUT, G.E. The estimation of microgram amounts of methionine by reaction with chloramine-T. *Analytical Biochemistry* 93: 419-422, 1979.

- (202)UTSUMI, S. Plant food protein engineering. *Advances in Food Research* 36: 89-96, 1992.
- (203)UTSUMI, S. & MORI, T. Heterogeneity of broad bean legumine. *Biochimica et Biophysica Acta* 621: 179-189, 1980.
- (204)VAINTRAUB, I.A.; BASSUNER, R. & SHUTOV, A.D. The action of trypsin and chimotrypsin on the reserve proteins of some leguminous seeds. *Die Nahrung* 20: 763-774, 1976.
- (205)VAINTRAUB, I.A.; SELIGER, P. & SHUTOV, A.D. The action of pepsin on the reserve proteins of some leguminous seeds. *Die Nahrung* 23: 15-26, 1979.
- (206)WALKER, A.F. The estimation of protein quality. In : HUDSON, B.J.F. (org.) *Developments in Food Proteins*. New York, 1983, Elsevier Sci. Publish. Co. Inc., v.1, p.293-323.
- (207)WALKER Jr., H.G.; KOHLER, G.O.; KUSMICKY, D.D. & WITT, S.C. Problems in analysis for sulfur amino acids in feeds and foods. In: FRIEDMAN, M. (org.) *Protein nutritional quality of foods and feeds*. New York, Ed. Marcel Dekker, 1975, v.1, p. 549-567.
- (208)WARNER, G.H. (org.) *Nutritional requirements of the laboratory rats*. Washington, NAS (NRC) Publication 990, 1962, p. 54-64.
- (209)WHITAKER, J.R. & SGARBIERI, V.C. Purification and composition of the tripsin-chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris*, L. var. Rosinha G2. *Journal of Food Biochemistry* 5: 197-213, 1981.
- (210)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. *Plant Foods for Human Nutrition* 31: 31-43, 1981.
- (211)WOLZAK, A.; ELIAS, L.G. & BRESSANI, R. Protein quality of vegetable proteins as determined by traditional biological methods and rapid chemical assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 1063-1068, 1981.
- (212)ZAHLER, W.L. & CLELAND, W.W. A specific and sensitive assay for disulfides. *The Journal of Biological Chemistry* 243: 716-719, 1968.