

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parcer

Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida por José Fer-
nando Durigan e aprovada pela
comissão julgadora em 17.09.85.
Campinas, 17 de setembro de 1985.

Valdemiro C. Sgarbieri
Presidente da Banca

"ESTUDO DA TOXIDEZ, COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRITIVO
DAS PROTEÍNAS DE CULTIVARES BRASILEIROS DE FEI-
JÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)"

José Fernando Durigan
Engenheiro Agrônomo

16/85

Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências de Alimentos.

Aos que confiaram em mim

D E D I C O

Aos meus irmãos, à Maria Lúcia e
aos meus filhos

O F E R E Ç O

A G R A D E C I M E N T O S

Aos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho, externo os meus mais sinceros agradecimentos e de modo especial:

ao Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri, pela orientação segura, compreensão e amizade durante todo o desenvolvimento desta tese;

à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP, pela oportunidade;

à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP, pela possibilidade tornada realidade;

aos colegas do Departamento de Tecnologia da F.C.A.V.J.-UNESP, pelo apoio humano e profissional;

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro;

à Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA), pela doação de xerocópias e capas dos exemplares;

ao Dr. Luiz D'Artagnan de Almeida, da Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelo plantio, condução e fornecimento dos grãos, dos cultivares estudados;

ao professor Benedito de Campos Vidal, do Instituto de Biologia, UNICAMP, pela atenção, colaboração e auxílio na realização, interpretação e fotografia dos cortes histológicos;

ao professor Felix G. Reyes, pela atenção e colaboração na realização das análises por cromatografia gasosa;

aos professores Maria Antonia M. Galeazzi, Jayme Amaya-Farfan, Alfredo Lam-Sanchéz, Raul Roberto de Souza Faleiros e Wanderley José de Melo, por toda colaboração prestada;

aos meus amigos Rubens Cruz, Walter A. Ruiz, Adilma R.P. Scamparini, Terezinha J. Garcia, Tânia G. Santa Rita; Pedro A. de Souza e Maria Amália B. Kaneshiro, que em diferentes momentos me emprestaram sua colaboração e auxílio;

às Sras. Luiza Maria Vilanova e Salete Ap. Costa Biondi, pelos serviços de datilografia.

Í N D I C E

	Página
1. RESUMO.....	01
2. SUMMARY.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
4.1. Composição em Aminoácidos e Propriedades <u>Nu</u> tricionais das Proteínas de Feijão.....	07
Composição em Aminoácidos.....	07
Valor Nutricional.....	10
Digestibilidade da Proteína.....	15
Disponibilidade Biológica dos Aminoácidos.....	19
4.2. Toxicidade Associada à Proteína de Feijões....	21
Inibidores de Enzimas Digestivas.....	21
Fitohemaglutinantes (Lectinas).....	26
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5.1. Material.....	46
5.2. Preparo das Amostras.....	46
Farinha Integral de Feijão Cru.....	46
Farinha Integral de Feijão Autoclavado.....	48
5.3. Análises Químicas.....	48
Umidade.....	48
Extrato etéreo.....	48
Proteína.....	49
Carboidrato Total.....	49
Tryptofânio.....	49
Aminoácidos Totais.....	49
Metionina.....	50
Fracionamento Protéico.....	51

	Página
Taninos.....	52
Enxofre Total.....	52
Nitrogênio Não Protéico.....	53
Ácidos Nucléicos.....	53
5.4. Análises Bioquímicas.....	53
Atividade do Inibidor da Tripsina.....	53
Atividade hemaglutinante.....	54
5.5. Ensaio Biológico.....	54
Preparo das Dietas.....	55
Quociente Protéico Líquido (NPR).....	56
Digestibilidade.....	56
Biodisponibilidade da Metionina.....	57
Balanços Metabólicos.....	58
Efeito Tóxico.....	59
5.6. Cortes Histológicos.....	59
6. RESULTADOS.....	61
6.1. Composição Centesimal	61
6.2. Conteúdo de Taninos e Atividade Antitriptica e Hemaglutinante.....	63
6.3. Toxicidade Relativa dos Cultivares.....	63
6.3.1. Experimento com 10% de proteína de fei jão.....	63
6.3.2. Experimento com 5% de proteína de fei jão + 5% de caseína.....	68
6.3.3. Experimento com proporções variáveis de feijão e de caseína.....	72
6.4. Valor Protéico Relativo dos Cultivares.....	91
6.4.1. Fracionamento protéico e conteúdo de	

	Página
6.4.2. Quantificação e biodisponibilidade da metionina.....	96
6.4.3. Avaliação biológica da proteína.....	100
7. DISCUSSÃO.....	108
7.1. Composição e Toxicidade Relativa dos Cultiva <u>res</u>	108
7.2. Valor Protéico Relativo dos Cultivares.....	114
8. CONCLUSÕES.....	121
9. LITERATURA CITADA.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.....	55
2	Conteúdo de proteína, extrato etéreo, carboidrato, cinza e enxofre, da farinha integral dos grãos de feijão dos cultivares estudados.....	62
3	Conteúdo de taninos e atividades antitriptica e hemaglutinante da farinha integral de grãos de feijão dos cultivares estudados.....	64
4	Resultados obtidos em ensaio biológico com <u>ra</u> tos Wistar, alimentados com ração contendo 10% de proteína, fornecida por farinha integral dos grãos crus dos cultivares estudados.....	65
5	Resultados obtidos em ensaio biológico com <u>ra</u> tos Wistar, alimentados com a ração contendo 10% de proteína, fornecida por caseína (5%) e farinha integral de feijão cru (5%), dos <u>culti</u> vares estudados.....	70
6	Resultados obtidos em ensaio biológico com <u>ra</u> tos Wistar, quando alimentados com rações <u>con</u> tendo 10% de proteína, fornecida por farinha de feijão cru ('Piratã-1', 'Rosinha G2' e 'Roxi	

- nho'), suplementada com caseína (Fase I = 7,5%; Fase = 5,0%; Fase III = 10%) em comparação a um grupo alimentado com ração de caseína durante todo o experimento..... 78
- 7 Variações de peso e balanço de nitrogênio em ratos da linhagem Wistar quando alimentados com rações contendo 10% de proteína, fornecida por farinha de feijão cru ('Piratã-1', 'Rosinha G2' e 'Roxinho'), suplementada com caseína, em comparação a grupos alimentados com ração de caseína (10% de proteína) e aprotéica..... 81
- 8 Quantidade de fezes produzidas e conteúdo de ácidos nucleicos nas fezes de ratos Wistar, alimentados com rações, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por misturas, em base protéica, de caseína e farinha integral de feijão com (Fase I = 7,5% caseína + 2,5% feijão; Fase II = 5% caseína + 5% feijão; Fase III = 10% caseína). Os grupos controles receberam: ração de caseína (10%) durante todo o ensaio; ração aprotéica nas Fases I e II e de caseína (10%) na Fase III 84
- 9 Resultados obtidos com o fracionamento protéico da farinha integral dos grãos de feijão dos cultivares estudados..... 92

10	Conteúdo de aminoácidos (g/100 g aa) da farinha integral de grãos de feijão dos cultivares estudados, cuja determinação foi feita por cromatografia de troca iônica.....	94
11	Conteúdo de aminoácidos (g/100 g aa) da farinha integral de grãos de feijão dos cultivares estudados, cuja determinação foi feita por cromatografia gasosa.....	95
12	Coeficientes de correlação entre as análises de aminoácidos feitas por cromatografia gasosa e de troca iônica.....	97
13	Conteúdo e biodisponibilidade da metionina, dos grãos dos cultivares estudados.....	98
14	Resultados obtidos em ensaios biológicos com ratos Wistar, alimentados com ração contendo 10% de proteína fornecida por farinha integral dos grãos de feijão, dos cultivares estudados, autoclavados (121 ^o , 10 min.).....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Grãos dos cultivares de feijão utilizadas no presente estudo.....	47
2	Índice de toxidez da proteína (perda de peso/ /proteína ingerida) em relação à atividade hema glutinante total, dos cultivares estudados.....	67
3	Curvas de crescimento de ratos albinos Wistar, quando alimentados com rações cujo conteúdo proteico (10%) foi suprido por farinha integral de feijão cru (5%) e por caseína (5%).....	69
4	Curvas de crescimento de ratos albinos, Wistar, alimentados com ração, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por misturas, em base protéica, de caseína e farinha integral de feijão cru (Fase I = 7,5% caseína + 2,5% feijão; Fase II = 5,0% caseína + 5,0% feijão; Fase III = 10% caseína). Os grupos controles foram: o que recebeu ração de caseína (10%) durante todo o ensaio e o que recebeu ração aprotéica nas Fase I e II e de caseína (10%) na Fase III.....	73
5	(Fase I) Curvas de crescimento de ratos albinos, Wistar, em dietas com 10% de proteína proveniente de caseína (7,5%) e de farinha integral de feijão cru (2,5%). Os grupos que recebe	

- ram ração de caseína (10%) e aprotéica foram considerados controles..... 74
- 6 (Fase II) Curvas de crescimento de ratos Wistar em dietas com 10% de proteína proveniente de caseína (5,0%) e de farinha integral de feijão cru (5,0%). Os grupos que receberam ração de caseína (10%) e aprotéica foram considerados controles..... 75
- 7 (Fase III) Curvas de crescimento de ratos albinos Wistar, quando todos os grupos receberam rações, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por caseína..... 76
- 8 Variação no conteúdo de ácidos nucleicos nas fezes de ratos Wistar, alimentados com rações, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por misturas, em base protéica, de caseína e farinha integral de feijão cru (Fase I = 7,5% caseína + 2,5% feijão; Fase II = 5,0% caseína + 5,0% feijão; Fase III = 10% caseína). Os grupos controles receberam: ração de caseína (10%) durante todo o ensaio; ração aprotéica nas Fases I e II e de caseína (10%) na Fase III..... 85
- 9 Cortes histológicos do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal), ali

	mentados por 10 dias com ração de caseína (10% de proteína).....	87
10	Cortes histológicos do intestino (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal), alimentados com ração contendo 10% de proteína, fornecida por farinha integral de grãos de feijão crus do cultivar Roxinho (5%) e caseína (5%).....	88
11	Cortes histológicos do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal) alimentados com ração contendo 10% de proteína, fornecida por farinha integral de grãos de feijão crus, do cultivar Piratã-1 (5%) e caseína (5%).	89
12	Corte histológico do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal), alimentados por 10 dias com ração aprotéica.....	90
13	Metionina biologicamente disponível na farinha dos feijões autoclavados (121°C, 10 min), dos cultivares estudados, em relação ao conteúdo deste aminoácido, determinado por cromatografia gasosa, tendo-se o BrCN como reagente (metionina potencialmente disponível).....	101
14	Conteúdo de enxofre total, dos grãos dos cultivares estudados, em relação ao quociente ganho de pe	

- so/consumo de proteína, obtido em ensaio biol^o
gico com ratos Wistar, alimentados com ração
contendo 10% de proteína fornecida por farinha
integral dos grãos de feijão, autoclavados (121^o,
10 min.) 104
- 15 Cortes histológicos do intestino delgado (duode
no) de ratos Wistar (secção longitudinal), ali
mentados por 10 dias com ração, cujo conteúdo
protéico (10%) foi suprido por farinha integral
de feijão autoclavado, do cultivar Roxinho..... 105
- 16 Corte histológico do intestino delgado (duode
no) de ratos Wistar (secção longitudinal), ali
mentados por 10 dias com ração, cujo conteúdo
protéico (10%) foi suprido por farinha integral
de feijão autoclavado, do cultivar Piratã-1.... 106

1. RESUMO

Este trabalho descreve a toxicidade e o valor protéico relativos a doze cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), produzidos pelo Instituto Agronômico de Campinas, ou seja: Aroana, Cara Suja, Jalo, Goiano Precoce, Carioca, Piratã-1, Iguaçu, Rico-23, Aeté-1, Aeté-3, Rosinha G2 e Roxinho.

Estabelecida a composição centesimal dos grãos de todos os cultivares, seguiu-se o estudo da toxidez verificando-se que ratos Wistar alimentados com farinha integral de grãos crus, como única fonte protéica, sucumbiam no período de 3,8 ('Goiano Precoce') a 8,4 dias ('Aroana'). Quando esta farinha integral foi misturada com caseína, evidenciaram-se prejuízos no aproveitamento da ração e no desenvolvimento dos animais, expressos pelas diminuições de peso, de digestibilidade, de valor biológico e de utilização líquida das proteínas (NPU). Estabeleceu-se um correlacionamento positivo e significativo entre a toxicidade, expressa em perda de peso proteína ingerida, e a atividade hemaglutinante total, enquanto que a atividade antitriptica e o conteúdo de taninos não mostraram correlação com o efeito tóxico.

O efeito prejudicial das lectinas manifestou-se pela interação das mesmas com as vilosidades intestinais, causando-lhes graves danos e levando os animais a um aproveitamento inadequado dos nutrientes da ração. Estes efeitos, quando

intensos e prolongados, podem levar os ratos à morte, apesar da capacidade de adaptação e/ou recuperação, demonstrada pelos mesmos.

As análises de aminoácidos, por cromatografia gasosa ou de troca iônica, revelaram-se equivalentes e comprovaram que as proteínas dos grãos dos cultivares estudados são deficientes em aminoácidos sulfurados e relativamente ricos em lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina + tirosina e treonina.

Não se detectou correlacionamento entre o conteúdo de enxofre total e os teores de aminoácidos sulfurados. Contudo, foram encontradas correlações positivas e significativas entre o conteúdo deste elemento e os valores de NPR, ganho de peso, ganho de peso/consumo de proteína, determinados com grãos autoclavados.

O conteúdo de metionina potencialmente disponível, da proteína dos grãos, determinado através da reação com BrCN e avaliação por cromatografia gasosa, apresenta correlação significativa com o de metionina biologicamente disponível.

O tratamento térmico foi bastante efetivo na eliminação da toxidez natural dos grãos, tornando suas proteínas capazes de promover o desenvolvimento dos ratos. A baixa digestibilidade destas proteínas, também foi atribuída à eliminação fecal de elevado teor glicoprotéico decorrente da exaustão e degradação, das células caliciformes, causada pela passagem do feijão através do trato intestinal dos animais.

Apesar das diferenças significativas na toxicidade de grãos crus dos cultivares estudados, o valor protéico foi equivalente para todos, quando estes foram tratados termi

2. SUMMARY

In the present work, the relative toxicity and protein value of seeds of twelve cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) were studied. Seeds of the cultivars Aroana, Cara Suja, Jalo, Goiano Precoce, Carioca, Piratã-1, Iguaçu, Rico-23, Aetê-1, Aetê-3, Rosinha G2 and Roxinho, were obtained from the Instituto Agronômico de Campinas, SP.

The percent composition of the seeds of all cultivars was ascertained. Toxicity studies showed that Wistar rats died within 3,8 ('Goiano Precoce') to 8,4 days ('Aroana') when fed whole seed flour, as the only protein source. When whole seed flour was mixed with casein, strong impairment to ration utilization and animal development, were observed, and they were expressed as loss of weight, decreased protein digestibility, biological value and net protein utilization. Positive and significant correlation between toxicity and hemagglutinin activity was established. On the other hand, antitryptic activity and tannin content did not show any correlation with the toxic effect.

The detrimental effect of lectins was evident by their interaction with the intestinal villi, which resulted in strong structure damage and, thus causing inadequate utilization of ration nutrients. These effects when strong and prolonged can cause the rat's death, in spite of their adaptive and

recovering capacity.

Amino acid determination by gas or ion exchange chromatography, showed equivalent results: the seed proteins of all cultivars studied were deficient in sulfur amino acids, but relatively rich in lysine, leucine, isoleucine, phenylalanine + tyrosine and threonine.

No correlation was detected between the total sulfur content and the content of sulfur amino acids in the protein. However, a positive and significant correlation was obtained between the sulfur content and NPR, weight gain/ protein consumption, determined in autoclaved seeds.

The content of biologically available methionine of seed proteins, was correlated with the content of chemically available methionine as determined by the reaction with BrCN and gas chromatography.

Heat treatment was effective for removing the natural toxicity of common beans, enabling the seed proteins to serve as growth promoters for the rat. The low digestibility of these proteins was believed to be due to the fecal elimination of high quantities of nitrogen, mainly glycoprotein as a consequence of the exhaustion and degradation of goblet cells; a direct result of the passage of raw bean components through the intestinal tract of the animals.

In spite of high difference in toxicity among the cultivars, the protein value was about the same for all cultivars studied.

3. INTRODUÇÃO

O gênero *Phaseolus* inclui espécies de leguminosas cujas sementes são geralmente conhecidas como feijão. O feijão consumido pelos brasileiros, *Phaseolus vulgaris* L., deve ter sido domesticado ^a aproximadamente 7.000 anos atrás na América Central, seu centro de origem, ao qual são incluídas as regiões do sul dos EUA, México e Norte da América do Sul (KAPLAN, 1965). Ele foi introduzido na Europa no século XVI e desde então tornou-se uma cultura muito importante para diversas regiões do mundo.

O conteúdo protéico das espécies e cultivares de *Phaseolus* varia de 18 a 35%. Dada a alta ingestão diária deste grão, imposta por problemas econômicos ou culturais, fica claro que o mesmo torna-se responsável pelo suprimento de parte significativa das proteínas, calorias e outros nutrientes, da dieta de enorme parcela da população mundial. Nesta parcela destacam-se os indianos, africanos e latino-americanos, sendo que para os brasileiros é praticamente a única semente leguminosa que aparece como componente da dieta diária e portanto responsável por grande parte do seu conteúdo protéico, principalmente para as classes sócio-econômicas menos favorecidas.

O valor biológico e nutricional das proteínas do feijão é limitado por vários fatores, quais sejam: quantidade limitante de aminoácidos sulfurados, baixa digestibilidade e

baixa disponibilidade biológica dos aminoácidos limitantes, as sim como pela presença de proteínas tóxicas e de outros fato res antinutricionais, especialmente quando crus ou mal processa dos. Apesar dos problemas mencionados é bastante difícil, ou mesmo impossível, a substituição do feijão por outra leguminosa na dieta dos brasileiros, a exemplo de tentativas feitas com a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) que, embora tenha valor nutricio nal mais elevado, simplesmente não é bem aceita como alimento humano, nos países ocidentais, apesar dos esforços institucio nais e governamentais visando sua introdução.

O feijão, apesar de sua importância como alimento e dos problemas que apresenta quanto à sua utilização biológica ainda não foi suficientemente estudado quanto à sua composição, valor biológico e propriedades físico-químicas. Este trabalho procurou buscar elementos que possam possibilitar o acrêscimo de novos conhecimentos sobre a composição, o valor nutritivo, a toxicidade e as propriedades biológicas das proteínas do fei jão (*Ph. vulgaris* L.).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Composição em Aminoácidos e Propriedades Nutricionais das Proteínas de Feijão.

O primeiro estudioso das proteínas do feijão foi OSBORNE (1984) que afirmou serem globulinas as extraíveis em maior rendimento, fato já confirmado e enfatizado por diversos pesquisadores (WATERMAN *et alii*, 1923; SAINT-PAUL *et alii*, 1956).

Composição em Aminoácidos

Um grande número de pesquisadores têm mostrado que as proteínas dos grãos de feijão, isoladas ou não, são deficientes em aminoácidos sulfurados (metionina, cisteína e cistina) e contêm alto teor de lisina (TANDON *et alii*, 1957; BRESSANI *et alii*, 1961; KING, 1964; KAKADE & EVANS, 1965a, b; JAFFÉ & HANNING, 1965; EVANS & BANDEMER, 1967; KELLY, 1971, 1973; MORAES & ANGELUCCI, 1971; ZUCAS *et alii*, 1971; BALDI & SALAMINI, 1973; PALMER *et alii*, 1973; JAFFÉ & BRÜCHER, 1974; TOBIN & CARPENTER, 1978; PUSZTAI *et alii*, 1979b; SGARBIERI *et alii*, 1979; SGARBIERI, 1980; SGARBIERI & POMPEU, s/d*; SGARBIERI *et alii*, s/d*.

TANDON *et alii* (1957) mostraram que enquanto o

* SGARBIERI, V.C. & POMPEU, A.S. Conteúdo protéico e composição em aminoácidos dos grãos de 120 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Não pu

conteúdo de lisina era alto para 25 cultivares de feijão (*Ph. vulgaris*) da América Central, os de triptofânio e metionina eram baixos, para todas elas. Lisina variou de 7,22 a 9,22% (g aminoácido/100 g proteína) (média 8,46%), triptofânio de 0,56 a 0,94% (média 0,68%) e metionina de 0,80 a 1,39% (média 1,17%). O conteúdo protéico destes 25 cultivares variou de 20,1 a 27,9% (média 24,1%). KING (1964) determinou o conteúdo em aminoácidos de 6 cultivares comerciais de *Ph. vulgaris* do Haiti ('Pois Blanc', 'Pois Rouge', 'Pois Buerre', 'Pois Noir', 'Pois Jeune', 'Pois Valet') e um de *Ph. lunatus* ('Pois Souche') e encontrou uma variação de 7,31 a 8,20% (média 7,90%) no conteúdo de lisina; de 0,44 a 0,98% (média 0,71%) no de 1/2 cistina; de 0,43 a 0,58% (média 0,50%) no de metionina para o *Ph. vulgaris* e valores de 7,52% para a lisina, 0,89% para a 1/2 cistina e 0,47% para a metionina do *Ph. lunatus*. BALDI & SALAMINI (1973) estudaram a composição em aminoácidos de 22 espécies de *Phaseolus* e encontraram valores para metionina variando de 0,70 a 1,55%, para 1/2 cistina de 0,55 a 2,28% e para lisina de 5,60 a 8,23%. JAFFÉ & BRÜCHER (1974) determinaram o conteúdo protéico e de aminoácidos sulfurados de 100 linhagens de feijões e os valores médios encontrados foram de 1,12% para a metionina, 0,98% para a cistina e de 22,7% para a proteína. PUSZTAI *et alii* (1979b) estudaram a composição e o valor nutritivo de 13 cultivares de feijão "kidney" (*Ph. vulgaris*) e detectaram (g aminoácido/100 g proteína) valores variando entre 1,1 a 1,8 para a metionina, de 0,7 a 0,9 para a 1/2 cistina e de 5,1 a 7,5 para a lisina. SGARBIERI *et alii* (s/d*) trabalhando com 60 cultivares de *Ph. vulgaris* encontraram teores protéicos (% N x 6,25) variando de 21,1 a 36,0%, de nitrogênio não protéico de 0,40 a 1,27%, enquanto

que os de metionina (g/100 g proteína) variaram de 0,40 a 1,48%. A relação entre os conteúdos de globulinas e de albuminas variou de 1,00 a 3,31. SGARBIERI & POMPEU (s/d*) analisaram 120 cultivares e para estes os conteúdos de lisina (g/100 g proteína), metionina e 1/2 cistina variaram de 5,56-9,60 (média 7,31), de 0,84-1,50 (média 1,10) e de traços -1,29, respectivamente. Os baixos teores de 1/2 cistina podem ser consequência da ação destrutiva da hidrólise ácida. O conteúdo protéico destes 120 cultivares variou de 18,9 a 34,0% (média 25,2%), em base seca.

Embora os trabalhos citados não representem uma lista completa do que já se fez quanto a determinação do conteúdo protéico e de aminoácidos das variedades existentes dentro do gênero *Phaseolus*, os dados apresentados parecem ser suficientes para indicar a variação e o valor médio do conteúdo protéico e dos aminoácidos mais importantes nos feijões. A metionina é muito importante por ser o aminoácido essencial mais limitante. A cisteína e a cistina embora não essenciais, têm sua importância destacada, pois a metionina é um intermediário na biosíntese dos mesmos e a lisina torna-se importante porque as proteínas de grãos de feijão têm sido utilizadas com resultados satisfatórios como complementar às proteínas de cereais, que possuem alta proporção de aminoácidos sulfurados mas são deficientes em lisina.

KELLY (1971) usando técnica microbiológica, determinou a porcentagem de metionina disponível em 3600 cultivares de *Ph. vulgaris*, cultivados em 1968 e 1969. Do material cultivado em 1968, 82 cultivares foram selecionados como tendo valores acima de 33% para a metionina microbiologicamente disponível e em 1969, destes cultivares selecionados 63 ainda continham valo

res acima de 33%. O padrão utilizado foi o feijão "navy" cv. Sanilac que foi selecionado por causa de sua pureza genética, uso bastante difundido e nível de metionina relativamente constante (~1,0% da proteína) quando cultivado sob as mais diferentes condições. O cultivar Sanilac continha 3,9% de nitrogênio e 0,98 de metionina total (g/100 g proteína), da qual 42% era biologicamente disponível. Desta pesquisa, concluiu-se que o nível de metionina em sementes de feijão comum é determinado geneticamente e que existe variabilidade suficiente para um trabalho de melhoramento.

HACKLER & DICKSON (1972) encontraram correlações bastante altas na herdabilidade para diferentes aminoácidos e isto indica a possibilidade de seleção para mais de um aminoácido ao mesmo tempo. A correlação positiva de 0,78 entre metionina e lisina é de grande significado, pois em qualquer programa de melhoramento genético visando aumentar o conteúdo de metionina, deve-se manter alto o de lisina.

Valor Nutricional

O valor nutricional das proteínas do feijão é geralmente baixo, quando comparado a outras proteínas alimentícias e o efeito da suplementação destas proteínas com aminoácidos sulfurados e outros aminoácidos limitantes tem sido demonstrado por vários pesquisadores (JAFFÉ, 1950a; KAKADE & EVANS, 1965a, b; EVANS & BANDEMER, 1967; MORAES e SANTOS & DUTRA DE OLIVEIRA, 1972; ANTUNES & MARKAKIS, 1977; ANTUNES *et alii*, 1979; SGARBIERI, 1979).

JAFFÉ (1950a) registrou que a adição de 0,3% de

sas, aumentou o coeficiente de utilização protéica (PER), mas que tal aumento não foi o mesmo para todos os casos. No caso do feijão preto (*Ph. vulgaris*) o PER aumentou de 0,0-0,9 a 3,5-3,8; do feijão vermelho (*Ph. vulgaris*) o PER aumentou de 0,0 para 1,7; e para o feijão branco (*Ph. vulgaris*) este aumento foi de 1,2 para 2,7. Este efeito diferencial da metionina foi atribuído a uma ou ambas, das seguintes razões: (a) para alguns grãos de feijão, a metionina pode não ser o único aminoácido limitante; (b) presença de substâncias antinutricionais, que inibiram a utilização completa da metionina adicionada.

KAKADE & EVANS (1965a) fracionaram a proteína do feijão "navy" em cinco frações, baseando-se na solubilidade diferencial das mesmas em vários solventes, adsorção a uma mistura de bentonita-celite (1:1) e precipitação com sulfato de amônio (0,75 de saturação). Todas as cinco frações, quando não aquecidas, prejudicaram o crescimento dos ratos quando adicionadas a rações de feijão autoclavado. A fração obtida por precipitação com sulfato de amônio apresentou-se como a mais tóxica, e a adição de 1% desta fração à ração de feijão autoclavado (PER = 1,5) levou o PER a valores negativos. Boa parte da atividade hemaglutinante estava na fração solúvel em sulfato de amônio e não era tão tóxica quanto a fração obtida por precipitação com este sal. Os autores sugeriram que as lectinas podem não ser os compostos mais tóxicos do feijão "navy" e assumiram que a lectina da fração solúvel em sulfato de amônio poderia ser idêntica a lectina não tóxica isolada por RIGAS & OSGOOD (1955).

EVANS & BANDEMER (1967) estudaram o valor nutritivo de várias sementes de leguminosas incluindo alguns cultiva

'red'). O feijão 'Red Kidney' apresentou-se como sendo o mais limitado em aminoácidos sulfurados quando comparados ao padrão de referência da FAO (FAO/OMS, 1973). O valor nutritivo relativo do feijão 'Sanilac' cresceu de zero para 38 pela autoclavagem (121°C , 15-30 min.) e do feijão 'Red Kidney', de zero para 51. Adição de 2,2% de metionina à proteína do feijão 'Sanilac' elevou o crescimento de ratos de 171% e a adição de 2,4% de metionina à proteína do feijão 'Red Kidney' elevou o crescimento de 400%.

MORAES e SANTOS & DUTRA DE OLIVEIRA (1972) trabalharam com extratos protéicos de *Ph. vulgaris*, cv. Goiano Precoce. O extrato obtido com solução aquosa a 1% de NaCl foi ajustado a pH 4,0 e o precipitado separado e seco em ar quente a 60°C (fração ácida insolúvel); o sobrenadante foi autoclavado (127°C , 15 min.) e as proteínas coaguladas, separadas (fração ácida solúvel). A terceira fração (isolado protéico total) foi obtido pela acidificação do extrato salino a pH 4,0 e autoclavagem imediata (127°C , 15 min.), seguida de separação do precipitado, o qual foi seco por corrente de ar quente (60°C). O isolado protéico total tinha 64,2% de proteína e representava 65% da proteína total do grão. A fração ácida insolúvel continha 66,5% de proteína e representava 32,5% da proteína total do grão. A fração ácida solúvel continha 59,1% de proteína e representava 32,5% da proteína total do grão. O feijão cru causou a morte de todos os ratos durante o experimento, enquanto que os grãos cozidos deram PER de 1,46. Quando a dieta contendo feijão cozido foi suplementada com 0,2% de DL-metionina o PER aumentou para 2,48. O isolado protéico total produziu morte em 33% dos ratos, mas quando suplementado com metionina (0,2%) não produziu mor

morte de 83% dos animais em ausência de metionina e de 50% quando 0,2% de DL-metionina foi adicionada à dieta. A fração ácida solúvel causou morte de 50% dos animais em ausência de metionina e seu PER foi de 2,3 quando 0,2% de DL-metionina foi adicionada à dieta.

ANTUNES & MARKAKIS (1977) mostraram que o valor biológico do feijão "navy" é bastante melhorado pela mistura com farinha de castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*), que é excepcionalmente rica em metionina (6,18 g/16 g N). Dietas preparadas com 10% de proteína de feijão "navy" autoclavado a 121°C por 10 minutos tiveram um PER de 1,53 enquanto a caseína teve 2,50. Quando se preparou dietas com 10% de proteína, com as seguintes proporções 80:20, 90:10, 95:5, de feijão:castanha, os valores de PER obtidos foram 2,42, 2,16 e 1,95, respectivamente.

ANTUNES *et alii* (1979) mostraram que a metionina pode ser introduzida em grãos de feijão por maceração em solução de DL-metionina 5%, por 1 hora a 50°C. Por este procedimento o conteúdo de metionina foi aumentado de 1,2 para 24 g/100 g de proteína do feijão. Os grãos enriquecidos, após secagem, foram misturados 1:7 (p/p) com grãos normais e a mistura, após cozimento, continha 3% de metionina em relação à proteína. A infusão com metionina aumentou o PER do feijão de 0,9 para 2,6 e a eficiência biológica de uma dieta contendo 10% de proteína de feijão, de 9,4 para 26,6%. A eficiência da suplementação de feijão (*Ph. vulgaris* cv. Rosinha G2) também foi demonstrada por SGARBIERI (1979). Suplementações com 3% de DL-metionina e 2% de L-cisteína (base protéica) melhorou o PER de uma dieta para ratos, com 10% de proteína de 1,17 para 2,47, para a farinha integral; de 0,70 para 4,00 para o isolado protéico total; de 0,50

ção globulina; e de 0,87 para 3,27 para o resíduo insolúvel, resultante da extração das proteínas. Todas as amostras foram autoclavadas (121°C, 15 min.) antes de seu uso no preparo das dietas. É interessante observar-se que a suplementação com uma mesma quantidade de metionina melhora o PER com diferentes intensidades para as diferentes frações. Todas as frações isoladas deram melhores respostas que a farinha integral, indicando a presença, neste material, de substâncias interferentes à utilização da metionina. Tais compostos são evidentemente termo-estáveis, mas sua natureza química não é conhecida.

Diferentes respostas à suplementação com metionina também foram relatadas por EVANS & BANDEMER (1967). Eles observaram que um mesmo nível de suplementação de metionina em rações de soja e de feijão "navy" forneceu melhores resultados para a soja. Esses autores, como também EVANS *et alii* (1974), observaram que soja contendo o mesmo nível de metionina que o feijão, exigia uma menor suplementação com metionina para produzir um máximo crescimento nos ratos. EVANS & BAUER (1978) estudando o valor nutritivo do feijão "navy" integral e frações protéicas isoladas, com e sem adição de metionina, concluíram que o feijão "navy" autoclavado contém, uma ou mais substâncias dialisáveis que inibem parcialmente, o crescimento do rato. Contudo, não identificaram tais substâncias. De acordo com esses autores, a presença de uma substância termorresistente, dialisável, inibidora do crescimento, explica as diferenças nas respostas à suplementação com metionina, do feijão "navy" quando comparado com a soja.

Digestibilidade da Proteína

Vários pesquisadores acreditam que a baixa digestibilidade das proteínas do feijão é uma das causas do seu baixo valor nutritivo (JAFFÉ, 1950b; JAFFÉ & VEGA LEITE, 1968; SEIDL *et alii*, 1969; LIENER & THOMPSON, 1980). JAFFÉ (1950b) encontrou valores de 76,8, 79,5 e 84,1% para a digestibilidade da proteína de feijão (*Ph. vulgaris*) preto, rosa e branco, respectivamente, e observou que a digestibilidade decresce com o aumento no conteúdo de pigmentos na casca dos grãos. Estes pigmentos são, geralmente, compostos fenólicos e é razoável acreditar-se que eles interagem com as proteínas, provocando decréscimo na sua digestibilidade e utilização.

JAFFÉ & VEGA LETTE (1968) relataram um efeito inibidor do feijão cru sobre a proteólise intestinal, não causada pelo inibidor da tripsina. Em ensaio com ratos jovens alimentados com uma ração contendo 40% de farinha de feijão cru de um cultivar com atividades antitriptica e hemaglutinante muito baixas, o crescimento e retenção de nitrogênio foi baixo, quando comparado ao controle, animais alimentados com idêntica ração, preparada com grãos autoclavados. A suplementação com caseína não incrementou o ganho de peso, mas com caseína digerida, sim. De acordo com estes autores, o baixo conteúdo da atividade antitriptica e o fato de que o inibidor da tripsina não interfere significativamente com a digestibilidade em ratos (PUSZTAI, 1967), sugerem que o inibidor da tripsina pode não ter sido a causa do baixo crescimento e da baixa retenção do nitrogênio.

Mesmo depois de um aquecimento apropriado, a digestibilidade do feijão 'Black Kidney' foi baixa, mas considera

LETTE. 1968). SEIDL *et alii* (1969) isolaram o principal componente da fração globulina, que denominaram fração E, representando 30% do conteúdo protéico total. Esta fração mostrou-se resistente à hidrólise por pepsina, tripsina, quimotripsina, papaina, ficina e subtilisina, e mesmo após desnaturação por calor ou uréia, houve pequeno aumento na hidrólise enzimática. A atividade das seis proteinases sobre substratos apropriados foi inibida por esta globulina, porém em menor grau que a inibição causada pelo inibidor da tripsina-quimotripsina. O nome "globulina inibidora da proteólise" foi proposto para esta proteína, pelo fato da globulina E representar uma grande porcentagem do conteúdo protéico total, de ser inibidora de proteases e resistente à proteólise, mesmo depois da desnaturação com calor e uréia. SEIDL *et alii* (1969) concluíram que esta fração protéica deveria ser a responsável, ao menos parcialmente, pela baixa digestibilidade e baixo valor nutritivo da proteína do feijão 'Black Kidney'.

Outras evidências de proteínas, da fração globulina, resistentes à proteólise foram mostradas por ROMERO & RYAN (1978) e LIENER & THOMPSON (1980). ROMERO & RYAN (1978) estudaram a digestibilidade "in vitro" da fração GI de três cultivares de *Ph. vulgaris* ('Improved Tendergreen'), 'PI 207222', 'BBL 240') pela tripsina, pepsina e quimotripsina. Acompanhando o efeito hidrolítico por eletroforese em gel de SDS (dodecil sulfato de sódio) eles concluíram que há um determinado número de ligações peptídicas facilmente hidrolisadas pela tripsina na globulina GI, a principal do gênero *Phaseolus*. Por outro lado, um número relativamente grande de peptídeos mostravam-se resistentes à ação da tripsina. Detectaram também um au

as enzimas testadas, após o aquecimento. ROMERO & RYAN (1978) concluíram que a molécula nativa da globulina GI apresenta uma conformação desfavorável para a ação proteolítica. Eles também verificaram que a concentração de taninos nas diferentes linhgens não apresentou nenhuma correlação com a susceptibilidade da proteína à hidrólise, mas que a adição de taninos implicou em decréscimo nesta susceptibilidade, "in vitro". A interferência dos taninos na digestibilidade das proteínas tem sido mostrada por vários investigadores, em estudos "in vitro" (BARBARA & STARKEY, 1966; FEENEY, 1969; RAMACHANDRA *et alii*, 1977) e em estudos "in vivo" (NELSON *et alii*, 1975; MARQUARDT *et alii*, 1977; WARD *et alii*, 1977).

Recentemente, LIENER & THOMPSON (1980) encontraram que ratos alimentados com dietas contendo globulina GI nativa, perdiam peso e que esta perda de peso não foi significativamente diferente daquela sofrida por animais tratados com dieta aprotéica. Ratos alimentados com GI aquecida cresceram, mas seus ganhos de peso estiveram muito abaixo dos alimentados com dieta de caseína. A melhora no ganho de peso, causada pelo aquecimento da globulina GI, foi acompanhada por um significativo aumento na digestibilidade da proteína, de 57% para 92,5%, quando comparadas com 95% para a caseína. Apesar da baixa atividade antitriptica da fração GI, o tamanho do pâncreas dos ratos alimentados com esta fração protéica foi significativamente maior que para aqueles que receberam GI aquecida, caseína ou dieta aprotéica. Em estudo similar, EL-HAG *et alii* (1978) relataram que a digestibilidade da fração E, isolada de feijão 'Red Kidney', de acordo com SIEDL *et alii* (1969), aumentou de 62,5% para 71,5%, com o aquecimento.

grãos autoclavados (121°C , 15 min.) de quatro cultivares de *Ph. vulgaris*, ou sejam, Rico-23, Rosinha G2, Carioca e Piratã-1, foi de 1,32 a 0,85, 0,75 e 1,12, respectivamente. A digestibilidade das proteínas variou de 39 a 45% para os feijões não aquecidos e de 60 a 66% após autoclavagem. Trabalhando com o cultivar Rosinha G2, SGARBIERI (1979) encontrou diferença marcante entre a digestibilidade da proteína total na farinha integral (59%), da proteína total isolada (73%) e da fração globulina (83%). Todas essas frações foram autoclavadas (121°C , 15 min.) antes do preparo das dietas. O efeito do aquecimento (97°C , 30 min.) na digestibilidade "in vitro" (pepsina seguida de pancreatina) destas frações de 'Rosinha G2', foi diferente para as diferentes amostras. A mudança na digestibilidade, resultante do aquecimento, foi a seguinte: farinha integral, de 27,5 para 39,0%, isolado protéico total, de 52,0 para 59,5%; fração albumina, 46,0 para 42,5%; e fração globulina, de 67,0 para 87,0%. É evidente que a fração globulina não somente tem a maior digestibilidade quando crua mas também mostra o maior incremento com o aquecimento. Por outro lado, as proteínas farinha integral e da fração albumina têm digestibilidade muito baixa quando cruas e o incremento é muito pequeno com o aquecimento, farinha integral, ou mesmo negativo, fração albumina. A baixa digestibilidade "in vitro" das proteínas da farinha integral e da fração albumina, foi inicialmente atribuída ao alto conteúdo de inibidores tripsina-quimotripsina, uma vez que os mesmos são resistentes ao tratamento térmico (97°C) e muito difíceis de serem inativados por acidificação ou neutralização da solução. Por outro lado, a

que, com o aquecimento, possibilitam reações do tipo Maillard que também prejudicam a digestibilidade.

MARQUES & LAJOLO (1981) estudaram quinze cultivares brasileiras de feijão e encontraram digestibilidade "in vitro", dos grãos crus, variando de 17 a 40%. Trabalhando com grãos dos cultivares Rosinha G2, Carioca, Roxinho e Rico-23 tratados termicamente (121°C, 30 min.) observaram que a digestibilidade "in vivo" variou de 69 a 72%. o fracionamento protéico do 'Carioca' mostrou que a digestibilidade "in vitro" das frações globulina e glutelina, quando cruas, era bastante baixa mas aumentou com o aquecimento, enquanto que a albumina era bem digerida no estado cru, o que diminuía com o aquecimento. Esta digestibilidade foi sempre obtida em relação à da caseína e o efeito do tratamento térmico nas albuminas mostrou-se pH dependente. Estes autores também evidenciaram a presença de inibidor de tripsina, relativamente estável ao calor, na fração albumina.

Disponibilidade Biológica dos Aminoácidos

Outro fator muito importante e que muito contribui para o baixo valor nutritivo das proteínas do feijão é a baixa disponibilidade biológica de alguns dos aminoácidos. SGARBIERI *et alii* (1979) encontraram disponibilidade da metionina, medida em ratos, variando de 29,3% para o cultivar Carioca a 40,6% para o Rico-23. No cultivar Rosinha G2, a disponibilidade da metionina, para o rato, foi: na farinha integral, 46,0%; no isola

albumina e do resíduo insolúvel deste cultivar é certamente devido a vários fatores, alguns ainda desconhecidos. Alguns dos fatores são: reações do tipo Maillard e outros tipos de reações que envolvem carboidratos, presentes em alta concentração nestas duas frações; presença de alta concentração de ligações dissulfídicas nas proteínas da fração albumina, que quando rompidas por sulfitólise ou por redução com ditiotreitol (SGARBIERI, 1979) verifica-se um aumento considerável na sua digestibilidade "in vitro"; e baixa disponibilidade da lisina, medida com o método do TNBS (ácido 2,4,6 - Trinitrobenzeno-sulfônico), que foi de 68,4% para a farinha integral, de 68,4% para o isolado protéico total, de 83,8 e 80,5%, respectivamente para as frações albumina e globulina e de 43,1% para o resíduo insolúvel.

EVANS *et alii* (1974) estudaram a disponibilidade da metionina e cistina em soja e feijão "navy" (*Ph. vulgaris*, cultivar Sanilac) empregando ensaio microbiológico com *Leuconostoc mesenteroides* P-60. Eles encontraram 51% e 74% de disponibilidade para a metionina, assim como 75% e 89% para a cistina, para o feijão "navy" e para a soja, respectivamente. EVANS & BAUER (1978) usando a técnica do balanço metabólico com ratos e feijão "navy", encontraram 50% de disponibilidade para a metionina e 41% para a cistina.

KAKADE *et alii* (1969b) estudaram a disponibilidade da cistina do inibidor da tripsina isolado do feijão "navy", para ratos. Uma dieta contendo uma mistura de aminoácidos sintéticos, isenta de cistina, foi comparada com a mesma dieta contendo 0,15% de L-cistina. Quando o inibidor da tripsina foi adi

(120°C, 2 h.) antes de sua adição à dieta, o ganho de peso e a eficiência alimentar da dieta foi comparável à que continha L-cistina adicionada.

4.2. Toxicidade Associada à Proteína de Feijões

Inibidores de Enzimas Digestivas

Na literatura já foram relatados, em feijão (*Ph. vulgaris*), dois tipos de inibidores de enzimas do trato digestivo, um que inibe o grupo de enzimas proteolíticas associadas à serina, destacando-se o inibidor de tripsina e de quimotripsina, e outro que inibe as α -amilases de origem animal e de insetos. A presença de inibidores de enzimas proteolíticas dos outros três grupos não tem sido relatada em feijão, o que pode ser devido à falta de pesquisa nesta área.

As proteínas que inibem a tripsina são encontradas em grande número de plantas, não surpreendendo que a atividade inibidora da tripsina tenha sido relatada na maioria das leguminosas examinadas. SGARBIERI *et alii* (s/d*) mediram a atividade inibitória da tripsina e da quimotripsina de 60 cultivares de *Ph. vulgaris* e encontraram inibição de ambas as enzimas, embora a relação das duas atividades inibitórias não fosse constante.

Entre os inibidores dos grãos de *Ph. vulgaris* que têm sido purificados e parcialmente caracterizados estão os dos feijões 'White Kidney' (PUSZTAI, 1966); "navy" (WAGNER & RIEHM, 1967; WHITLEY & BOWMAN, 1975); 'French' (BELITZ & FUCHS, 1972, 1973); 'Great Northern' (WILSON & LASKOWSKI JR., 1973; RTRK

1976); 'Pinto' (WANG, 1975) e 'Rosinha G2' (WHITAKER & SGARBIERI, 1981; SGARBIERI & WHITAKER, 1981).

Os inibidores geralmente levam o nome da primeira protease contra a qual foram testados, geralmente tripsina. Os inibidores de tripsina, geralmente inibem a tripsina na relação 1:1 (JONES *et alii*, 1963; CHU *et alii*, 1964; PUSZTAI, 1966; YAMAMOTO & IKENAKA, 1967; BELITZ & FUCHS, 1972; WILSON & LASKOWSKI JR., 1973; WANG, 1975), embora já se tenha detectado inibidores cuja relação é 2:1, isto é, dois moles de enzima inibidos por um de inibidor (WAGNER & RIEHM, 1967; WHITAKER & SGARBIERI, 1981). Estes inibidores com relação enzima/inibidor maior que 1:1 apresentam peso molecular entre 20.000-23.000 enquanto que outros têm peso molecular de 8.000-10.000. Esses inibidores também podem inibir a quimotripsina, assim como proteases do tipo elastase e plasmina.

Os inibidores de protease em leguminosas são tendo sido encontrados nos grãos (KAPOOR & GUPTA, 1978), com a sugestão de que eles são sintetizados nas sementes durante a sua formação e que não são translocados para as outras partes da planta. Os cotilédones contêm cerca de 83% do conteúdo total do inibidor de tripsina da semente, enquanto que o embrião não apresenta atividade.

Os inibidores representam cerca de 0,2 a 2,0% do conteúdo total das proteínas solúveis da semente do feijão. WHITAKER & SGARBIERI (1981) trabalhando com o feijão 'Rosinha G2', encontraram um conteúdo de cerca de 0,24%; ABRAMOVA & CHERNIKOV (1964) encontraram 0,27% para o feijão "kidney"; e KOZLOWSKA *et alii* (1976) encontraram 2% para a soja. Os valores citados por

teases para as sementes, ainda não é conhecido. Somente os do feijão-da-Índia mostraram atividade contra proteases do próprio cotilédone (BAUMGARTNER & CHRISPEELS, 1976). Contudo, já se detectou que o conteúdo de inibidores varia com o estágio de crescimento da planta, o que sugere sua importância ao organismo (RICHARDSON, 1977). RYAN (1973) e RICHARDSON (1977) sugeriram que os inibidores podem estar envolvidos com o mecanismo de defesa da planta contra o ataque de insetos e microrganismos, mas ainda é necessário muita pesquisa para que este aspecto seja esclarecido.

A composição em aminoácidos dos inibidores de proteases isolados (WANG, 1975; WHITAKER & SCARBIERI, 1981) parece ser similar ao inibidor Bowman-Birk da soja (YAMAMOTO & IKENAKA, 1967).

Uma característica comum do inibidor Bowman-Birk como os de feijões é sua grande estabilidade, em contraste com o inibidor de Kunitz da soja. WHITAKER & SCARBIERI (1981) trabalhando com o inibidor de feijão 'Rosinha G2' encontraram que este inibidor retinha 100% de sua atividade depois de um aquecimento a 97°C por 15 minutos, era estável a pHs entre 2 e 12 a 25°C e não era digerido pela pepsina a pH 2. FRAENKEL-CONRAT *et alii* (1952) mostraram que os inibidores do feijão-de-lima eram estáveis ao aquecimento a 90°C por 15 minutos a pH 5 ou 7, quando eram mantidos em NaOH 0,01 M por 24 horas a 23°C ou em HCl 0,01 M a 40°C por 24 horas. BANERJI & SOHONIE (1969) encontram para o feijão 'Field' perda de 59% da atividade inibidora em 30 min. e 86% em 60 min., a 100°C e pH 7,2. Autoclavagem a 15

vidade em 2 horas, a pH 2 e 37°C, quando mantido em presença de pepsina. Os inibidores do feijão-de-lima mostraram-se resistentes à pepsina por 24 horas a pH 2 (FRAENKEL-CONRAT *et alii*, 1952) e pH 1,5 (JONES *et alii*, 1963).

O interesse despertado inicialmente pelos inibidores de protease para os nutricionistas foi com respeito ao efeito destas substâncias na alimentação de animais e humanos. Ratos recém-desmamados, quando alimentados com farinha de feijão cru de *Ph. vulgaris*, 'Rosinha G2, morreram antes do 21º dia (ANTUNES & SGARBIERI, 1980). É bem conhecido o efeito do aquecimento dos grãos, no decréscimo da toxicidade e na melhora da qualidade nutricional dos grãos de feijão. Cerca de 40% do efeito total do aquecimento foi atribuído à destruição dos inibidores de proteases, em soja, segundo KAKADE *et alii* (1973), que isolaram os inibidores através de cromatografia de afinidade. Entretanto, quando se fala do efeito do aquecimento não se deve esquecer da destruição de lectinas, de substâncias bocígenas, de possíveis inibidores da amilase e da melhora na digestibilidade pela desnaturação das proteínas (KAKADE *et alii*, 1973; RACKIS, 1974; BOONVISUT & WHITAKER, 1976; SAVAIANO *et alii*, 1977). O aquecimento prolongado não só destrói os efeitos tóxicos, como também diminui a digestibilidade e a disponibilidade de aminoácidos essenciais.

A presença de inibidores de protease, de soja, no intestino delgado estimula a secreção de suco pancreático (KHAYAMBASHI & LYMAN, 1969). LYMAN e seus colaboradores (GREEN & LYMAN, 1972; LYMAN *et alii*, 1974; SCHEEMAN & LYMAN, 1975) encontraram que a presença de inibidores de protease...

resulta da complexação com os inibidores. Isto tem sido proposto (LIENER, 1979) como um mecanismo de "feedback", o qual controla o nível de proteases do intestino delgado. A alimentação contínua com soja crua provoca um aumento no pâncreas, como resultado de hiperplasia e de hipertrofia de células pancreáticas, aparentemente devido à necessidade de trabalho mais intenso deste órgão, para suprir o nível requerido de proteases.

Há também a possibilidade de que algum retardo no crescimento de ratos alimentados com farinha integral de feijão cru, seja devido à não disponibilidade de aminoácidos sulfurados, especialmente cistina, dos inibidores da tripsina (KAKADE *et alii*, 1969 b).

Muitos dos trabalhos com inibidores foram feitos com a soja, havendo necessidade de mais pesquisas com o gênero *Phaseolus*.

MANCINI FILHO & LAJOLO (1981) estudaram a toxidez de 15 cultivares brasileiros de feijão (*Ph. vulgaris*) e de 01 cultivar de *Vigna unguiculata* e não encontraram qualquer relação entre os teores dos inibidores da tripsina e a toxicidade dos mesmos, quando seus extratos eram injetados intraperitonalmente em camundongos.

SGARBIERI (1979) não encontrou qualquer efeito da adição de inibidores da tripsina-quimotripsina isolados (nível de 1%) à dieta de caseína oferecida para ratos submetidos a um balanço de nitrogênio por 5 dias. Não se conhece trabalhos em que se tenha usado a adição de inibidores em rações para ratos

rios órgãos e fluídos do corpo humano (WHITAKER, 1981), ainda se conhece muito pouco da importância farmacológica dos inibidores de protease de feijões.

Fitohemaglutininas (Lectinas)

De acordo com BOYD (1963) a atividade hemaglutinante foi descrita pela primeira vez em 1888 por Stillmark, em extrato de mamona (*Ricinus comunis*) e a primeira fitohemaglutinina específica para o sangue foi isolada do feijão-de-lima (*Ph. lunatus*).

Lectinas são glicoproteínas com a propriedade de ligarem-se especialmente a sacarídeos e proteínas contendo sacarídeos, de maneira altamente específica. Além disso, podem interagir também com vários tipos de células. A lectina do feijão 'Red Kidney' (*Ph. vulgaris*) pode transformar linfócitos do sangue periférico em células grandes e morfologicamente primitivas, as quais podem sofrer mitose (NOWELL, 1960b). Este fenômeno é acompanhado de um aumento na biossíntese de proteínas e de ácidos nucléicos. NORDMAN *et alii* (1964) verificaram que a lectina de *Phaseolus* pode causar aglutinação de leucócitos.

ALLEN & BRILLIANTINE (1969) analisaram 2663 espécies vegetais e mostraram que 800 contêm atividade hemaglutinante. Na família *Leguminosae* acima de 600 espécies e cultivares contêm lectinas (TOMS & WESTERN, 1971). Proteínas capazes de interações com substâncias contendo carboidratos também já foram encontradas em células vivas de animais e microrganismos: inver

BER, 1972); líqüem (HOWE & BARRET, 1970) e tecidos de mamíferos (ROBERTS & BOURSNEILL, 1974; STOCKERT *et alii*, 1974).

No gênero *Phaseolus*, as lectinas têm sido encontradas principalmente em sementes. SUSPLUGAS & COULET (1954) sugeriram que as fitohemaglutininas são sintetizadas nas folhas das plantas, mas não acumuladas nas mesmas, pois são transportadas e armazenadas nos cotilédones. Estão localizadas no citoplasma das células cotiledonares e embrionárias (MIALONIER *et alii*, 1973) e aparecem durante o desenvolvimento inicial e diferenciação do embrião (HOWARD *et alii*, 1972). Durante a germinação o conteúdo de lectina decresce paralelamente à perda de proteínas de reserva (ROUGÉ, 1974a, b).

As hemaglutininas representam de 2 a 10% do conteúdo protéico das sementes de leguminosas, o que sugere a possibilidade de que estas substâncias tenham um importante papel na fisiologia das plantas. Algumas das funções sugeridas (TOMS, 1971; SHARON & LIS, 1972) e sumarizadas por LIENER (1976) são as seguintes: a) atuação como anticorpos para neutralizar as bactérias do solo; b) proteção às plantas contra ataque de fungos, inibindo suas polissacaridases; c) transporte e armazenamento de açúcares; d) ataques a enzimas glicoprotéicas em sistemas multienzimáticos organizados; e) teriam importante papel no desenvolvimento e diferenciação das células embrionárias.

No gênero *Phaseolus* mais de 200 espécies exibem atividade hemaglutinante (NOWAKOVÁ & KOCOUREK, 1974) e estas espécies podem ser divididas em três grupos, de acordo com sua capacidade hemaglutinante e especificidade: a) um grupo repre

cretor de saliva B, mas não precipita o secretor da saliva do tipo O e a saliva de qualquer dos não secretores (BOYD & SHA PLEIGH, 1954b; BOYD *et alii*, 1955); b) muitas espécies e cultivares de *Ph. vulgaris* contêm lectinas que reagem não especificamente com eritrócitos humanos de todos os grupos sanguíneos. A atividade mitogênica exibida por muitas lectinas foi descoberta inicialmente em extrato de feijão 'Red Kidney' (*Ph. vulgaris*) (HUNGERFORD *et alii*, 1959; NOWELL, 1960a, b); c) um terceiro grupo de espécies de *Phaseolus* foi descrito, no qual as proteínas não mostram atividade hemaglutinante aparente (BRÜCHER *et alii*, 1969; PALOZZO & JAFFÉ, 1969).

As lectinas de *Phaseolus vulgaris* são um sistema mais complexo de isoglicoproteínas que as lectinas do feijão-de-lima. Elas não são inibidas por um simples monossacarídeo ou derivados de açúcares, mas somente por carboidratos complexos, normalmente ligados a glicoproteínas ou peptídios. Os requerimentos estruturais requeridos para essa ligação ainda não estão definidos. Elas aglutinam eritrócitos e leucócitos com diferentes intensidades e também mostram ação estimulante sobre linfócitos resultando em mudanças morfológicas e divisão (mitose).

Devido ao grande número de cultivares de *Ph. vulgaris* estudados, às diferentes técnicas empregadas para extração e purificação e às diferentes propriedades estudadas pelos vários pesquisadores, os resultados são muito difíceis de serem correlacionados.

A lectina mais extensivamente estudada deste grupo é a do feijão 'Red Kidney' (ALLEN *et alii*, 1969; YACHNIN & SVENSON, 1972; YACHNIN, 1973; 1974; 1975; 1976; 1977; 1978; 1979; 1980; 1981; 1982; 1983; 1984; 1985; 1986; 1987; 1988; 1989; 1990; 1991; 1992; 1993; 1994; 1995; 1996; 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2002; 2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019; 2020; 2021; 2022; 2023; 2024; 2025).

17 bandas protéicas diferentes em eletroforese em gel de poliacrilamida. Cromatografias da mesma amostra em CM-Sephadex e Sephadex G-150 possibilitaram a separação de várias proteínas com atividade mitogênica e hemaglutinante, distintas. O isolado protéico mais mitogênico (L-PHA) era homogêneo e tinha considerável atividade leucoaglutinante. A fração contendo duas proteínas relacionadas (H-PHA) apresentou atividade hemaglutinante 250 vezes maior que a fração L-PHA. Esta fração tinha alguma atividade leucoaglutinante e atividade mitogênica levemente inferior à L-PHA. A composição em aminoácidos e carboidratos destas duas frações eram similares, mas a H-PHA continha cerca de duas vezes mais carboidratos que a L-PHA e tinha um peso molecular ligeiramente superior, quando medidos por ultrafiltração em gel. As duas frações continham 2-amino-2-desoxiglicose e manose, e um pouco menos de xilose e arabinose ou fucose.

YACHNIN e seus colaboradores (ALLEN *et alii*, 1969; YACHNIN & SVENSON, 1972; YACHNIN *et alii*, 1972; MILLER *et alii*, 1973, 1975) propuseram que as lectinas do feijão 'Red Kidney' são moléculas tetraméricas, que são formadas de combinações de duas unidades levemente diferentes (L e R), que resultam em uma família de cinco isolectinas. A existência de duas sub-unidades diferentes de lectina de *Ph. vulgaris* já foi confirmado por vários pesquisadores (WEBER & BRÄSBECK, 1968; ALLAN & CRUMPTON, 1971; OH & CONARD, 1972; WEBER *et alii*, 1972). As sub-unidades podem ser diferenciadas pela sequência de aminoácidos, pontos isoelétricos e propriedades biológicas.

A leucoaglutinina (L-PHA) contém 4 sub-unidades idênticas com um ponto isoelétrico de 5,25 e a serina como

de aminoácidos sulfurados. Ela contém 2-amino-2-desoxiglicose e manose como carboidratos e Mn^{++} e Ca^{++} , como íons essenciais para estimular as atividades leucoaglutinante e finfócita.

JAFFÉ & HANNING (1965) e JAFFÉ *et alii* (1972) isolaram e caracterizaram as proteínas do cultivar de feijão Black Kidney e estas análises mostraram que as proteínas possuíam propriedades hemaglutinante e mitogênica. Estas lectinas eram glicoproteínas. Anti-soro de coelho preparado contra proteínas do feijão 'Black Kidney' reage com as proteínas hidrossolúveis de feijões 'White Kidney' e 'Red Kidney'. Entretanto, cada cultivar de feijão "kidney" deu diferente padrão imunoeletroforético.

PUSZTAI & WATT (1974) purificaram e estudaram isolectinas de feijões 'Haricot Kidney' (*Ph. vulgaris*) e encontraram dois tipos de sub-unidades glicoprotéicas de peso molecular entre 30.000 e 35.000. Embora estas glicoproteínas mostrem ser aglutinantes de células vermelhas e brancas do sangue, elas têm efeito desprezível sobre a transformação de linfócitos.

PUSZTAI & STEWART (1978) separaram dois grupos de lectinas de *Ph. vulgaris* cv. Processor, baseados nas suas diferentes solubilidades a pH 5,0. As isolectinas da albumina compreendem 5 componentes principais com pontos isoelétricos entre 4,6 e 5,2. As lectinas das globulinas praticamente sobrepõe-se quanto ao ponto isoelétrico às das albuminas e contém alguns componentes com pontos isoelétricos altos. Os dois grupos possuem composição em aminoácidos e açúcares similares mas somente parcialmente idênticas pelos critérios imunológicos. Elas pos

receptores dos eritrócitos. A eritroaglutinina (H-PHA) é formada de quatro sub-unidades R idênticas, com um ponto isoelétrico de 5,95 e contém alanina como resíduo N-terminal. As três isolectinas mitogênicas contêm várias proporções de sub-unidades L e R (LR_3 , L_2R_2 , L_3R). A atividade mista, leucócito-eritrócito a glutinante, mostrada por estas isoelectinas pode ser um reflexo de suas estruturas híbridas. Elas também mostram uma atividade linfócito mitogênica, proporcional aos seus conteúdos de sub-unidades L.

As sub-unidades L e R têm sido isoladas em forma homogênea por focalização isoelétrica em uréia 8 M (MILLER *et alii*, 1973, 1975). Elas possuem peso molecular idêntico, cerca de 34.000, e falta de metionina, cisteína e cistina. As sub-unidades diferem na sequência de aminoácidos dos resíduos de 1 a 7 (aminoterminal), mas são idênticas nas posições 8 a 24 e no resíduo C-terminal. O 12º resíduo de cada unidade é uma asparagina glicosilada; a composição em carboidratos das duas sub-unidades é idêntica. A grande similaridade entre as sub-unidades é patente e de acordo com os autores citados, a diferença nas propriedades biológicas entre as duas sub-unidades é o resultado de diferenças relativamente pequenas na estrutura primária.

Lectina com alta atividade leucoaglutinante já foi purificada (WEBER, 1969; RÄSÄNEN *et alii*, 1973) por precipitação fracionada com etanol, seguida de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose e SP-Sephadex e cromatografia de exclusão em Sephadex G-150. A lectina cristalina mostrou-se homogênea por vários critérios e era formada de quatro sub-unidades

L de peso molecular 34.000

taram a presença, na fração albumina de uma pequena unidade, 25 S em equilíbrio com o protômetro de albumina.

As isolectinas encontradas em feijões 'Haricot Kidney' (PUSZTAI & WATT, 1974) são diferentes em número, tamanho e comportamento físico-químico das encontradas no cultivar Processor (PUSZTAI & STEWART, 1978). Devido às variações entre cultivares e preparações e à existência de dois grupos distintos (albuminas e globulinas) de isolectinas com propriedades físico-químicas e imunológicas distintas, PUSZTAI & STEWART (1978) sugeriram que é provável a existência de mais de cinco isolectinas ocorrendo naturalmente nas diferentes variedades e cultivares de *Ph. vulgaris*.

PUSZTAI *et alii* (1979c) isolaram um polipeptídio (PM 30.000), com atividade hemaglutinante muito forte, da membrana dos corpos protéicos do cultivar Processor. Aglutina eritrócitos de coelho em concentração tão baixa quanto 1 µg/ml. Quando dissolvido em guanidina-HCl 5 M e cromatografada em Bio Gel A5m, o polipeptídio de PM 30.000 dá duas frações principais. Ambas, recuperadas pelo Bio-Gel, são ativas como lectina e mostram uma banda de PM 30.000 em eletroforese em gel de SDS (dodecil sulfato de sódio). Focalização isoelétrica dá um componente principal (pI = 5,8) e três, menores, com pontos isoelétricos mais ácidos.

As lectinas de membrana de *Ph. vulgaris* cv. Processor dão reações de identidade com a lectina da globulina em testes de difusão dupla, mas não reagem apreciavelmente com o soro anti-lectina de albumina, o qual é produzido contra isolec

similar à isoelectina globular descrita anteriormente (PUSZTAI & WATT, 1974; PUSZTAI & STEWART, 1978).

PUSZTAI *et alii* (1979b) verificaram que cerca de 10% das proteínas das sementes de *Ph. vulgaris* pode ser considerado lectinas. Dois terços do conteúdo total de lectinas da semente são isoelectinas do tipo albuminas e parecem pertencer à matrix ou proteínas de reserva, as quais são sintetizadas tardiamente durante a maturação da semente. Tem sido sugerido que as isoelectinas do tipo globulinas, são sintetizadas no início do desenvolvimento da semente e estão intimamente envolvidas na formação e estabilização das membranas que envolvem os corpos protéicos.

ANDREWS (1974) isolou uma lectina de feijão "navy", que tinha forte atividade eritroaglutinante, assim como leucoaglutinante. Foi caracterizada como um tetrâmetro com quatro sub-unidades idênticas de peso molecular 32.000. Apesar de ter grande semelhança em peso molecular, composição em aminoácidos e conteúdo de carboidratos, com as lectinas do feijão 'Red Kidney' o fato de apresentar duas diferentes atividades aglutinantes, faz com que a estrutura proposta por YACHNIN *et alii* (1972) para o feijão 'Red Kidney', torne-se inconsistente para este caso. Uma explicação alternativa pode ser, por exemplo, a de que uma mesma sub-unidade seja capaz de aglutinar eritrócitos e leucócitos.

A hemaglutinina de feijão "wax" (*Ph. vulgaris*, cv. Sure Crop Stringless Wax) foi purificada inicialmente por TAKAHASHI *et alii* (1967), cujo resultado final, quanto ao conteúdo

DAHLGREN *et alii* (1970) isolaram duas lectinas de *Ph. vulgaris* cv. Blue Lake, sendo uma delas (PHA-a) purificada até a homogeneidade e com peso molecular consideravelmente menor, 83.000, que muitas das lectinas de *Ph. vulgaris*. Estes dados foram confirmados por HÖGLUND & DAHLGREN (1970).

MIALONIER *et alii* (1973) usando técnicas convencionais de purificação de proteínas, isolou uma lectina de *Ph. vulgaris*, cv. Red, localizada no citoplasma do cotilédone e das células embrionárias de semente.

Dos cultivares brasileiros de *Ph. vulgaris*, MOREIRA & PERRONE (1977) isolaram duas frações protéicas com atividade hemaglutinante, LcPA e LcPB, de *Ph. vulgaris*, cv. Rico-23. A fração LcPA mostrou-se homogênea à eletroforese de disco, em gel, e à focalização isoelétrica a pH 5,1 e um coeficiente de extinção a 280 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) de 7,85. Seu conteúdo de açúcares neutros foi de 9,11%, de aminoaçúcares de 1,44% e apresentou teor muito baixo de metionina e meia-cistina, com predominância de aminoácidos ácidos e hidroxilados.

JUNQUEIRA & SGARBIERI (1981) isolaram uma lectina de *Ph. vulgaris*, cv. Rosinha G2, por cromatografia de afinidade em Concanavalina A-Sepharose e cromatografia de exclusão em Sephadex G-200, a qual era uma glicoproteína com 8,3% de carboidrato neutro e 2,1% de glicosamina; cujo conteúdo de aminoácidos sulfurados era muito baixo e o de ácido aspártico, serina, treonina e triptofânio bastante alto. Seu pI estava entre 5,5-5,7 e seu peso molecular era de 136.000.

A especificidade da ligação das lectinas de *Pha*
seolus às membranas celulares foi estudada por KORNFIELD e seus

tratamento de eritrócitos humanos com tripsina liberava um glicósido solúvel (PM 10.000), que quando ligado à lectina purificada de *Ph. vulgaris* eliminava suas propriedades eritroaglutinantes e estimulante de linfócitos e era um excelente inibidor da lectina de *Ph. vulgaris*, indutora de aglutinação celular. A remoção do resíduo de ácido siálico, por tratamento com neuraminidase, não afetou sua atividade, enquanto que o tratamento do produto dialisado com β -D-galactosidase destrói a habilidade do glicopeptídeo, de inibir a hemaglutinação.

A purificação de um segundo glicopeptídeo de eritrócitos foi também descrita por KORNFIELD & KORNFIELD (1969) no qual os resíduos de β -D-galactosil apareciam como penúltimos, antes do ácido siálico. O tratamento com neuraminidase não afetou sua potência como inibidor. KORNFIELD *et alii* (1971) isolou dois glicopeptídeos da imunoglobulina G; SPIRO (1964) um da fetuina e JAMIESON (1966) um da transferrina. Estes estudos sugerem que uma estrutura bifurcada contendo nos dois terminais β -D-galactopiranosil ou antecededidos por ácido siálico, são requeridos para uma eficiente ligação às lectinas de *Ph. vulgaris*.

ULENBRUCK *et alii* (1970) reportou que um trissacarídeo, β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3,4)- β -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man, é um componente essencial das glicoproteínas reativas com lectinas de feijão 'Red Kidney'. Este trissacarídeo foi sintetizado por KAIFU & OSAWA (1976), que detectaram atividade inibidora da hemaglutinação de O-eritrócitos por lectinas de *Ph. vulgaris*.

Um número considerável de revisões sobre a toxicidade e importância nutricional das lectinas têm sido publicadas (LIENER, 1962, 1974, 1979; JAFFÉ, 1973, 1980).

ção cru ou impropriamente cozido tem sido feitas desde o início deste século. Diferenças de opinião sobre a toxicidade das lectinas são encontradas na literatura antiga (WEINHAUS, 1909; SCHNEIDER, 1911; LÜNING & BARTELS, 1926; GODDARD & MENDEL, 1929). Entretanto, muitas das controvérsias são fruto das diferenças entre os materiais estudados. De MUELENAERE (1965) estudou a atividade hemaglutinante de sementes de várias cultivares de *Ph. vulgaris* e descreveu uma variação de 155.000 unidades hemaglutinantes por grama (HU/g) para o feijão 'Natal Round Yellow' a 3.200 HU/g para o feijão 'Butter'. O título hemaglutinante de cresceu rapidamente com autoclavagem e em todos os casos em que a atividade hemaglutinante esteve acima de 1.000 o extrato foi tóxico, quando injetado intraperitonealmente. Ele concluiu que a hemaglutinação sozinha não era responsável pela toxicidade do feijão. Feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) era extremamente tóxico embora a atividade hemaglutinante era somente de 1200 HU/g, enquanto que o feijão 'Haricot' (*Ph. vulgaris*) com atividade hemaglutinante de 40.000 HU/g não era tóxico.

JAFFÉ (1962) fez um estudo detalhado da toxicidade de várias frações de lectinas de *Ph. vulgaris*. Ele encontrou grandes diferenças na toxicidade quando as diferentes frações foram injetadas em camundongos, com correlação positiva entre toxicidade e atividade hemaglutinante. Uma das frações mais tóxicas (LD de 50 mg/kg de peso vivo) foi equivalente a 0,0014 e 0,025 vezes a toxidez da ricina e à da toxina da difteria, respectivamente. Esta fração chamada faseolotoxina A, inibiu fortemente o crescimento de ratos. Quando lectina ativa estava presente na dieta havia um pronunciado decréscimo na absorção de

A absorção de glicose decresceu de 50% em "alças" intestinais cobertas com solução contendo lectinas. Os autores sugeriram que as lectinas, em um processo similar à reação com os eritrócitos, também combinam-se com as células da mucosa intestinal e microvilosidades, causando então uma interferência não específica na absorção intestinal e utilização de nutrientes.

HONOVAR *et alii* (1962) acrescentou a uma dieta para ratos, contendo 10% de caseína, vários níveis de frações hemaglutinantes ativas, isoladas de feijão 'Red Kidney' e de feijão 'Black Kidney'. Uma inibição significativa ao crescimento foi observada para o nível de 0,5% de lectina, na dieta, embora no caso de feijão 'Black Kidney' não houvesse morte dos animais. A inibição do crescimento foi muito mais pronunciada para as lectinas do feijão 'Red Kidney' cujo nível de 1,5% na dieta matou os ratos, enquanto que as do feijão 'Black Kidney' causaram a morte dos animais somente ao nível de 4,6%.

As lectinas de diferentes cultivares de feijão mostraram diferentes níveis de toxicidade (JAFFÉ, 1968; JAFFÉ & VEGA LETTE, 1968; MANCINI FILHO & LAJOLO, 1981). STEAD *et alii* (1966), não encontraram correlação direta entre hemaglutinação e toxidez quando estudaram o efeito tóxico de frações protéicas, separadas por cromatografia, de sementes de *Ph. vulgaris* e *Glycine max*. Este estudo sugere que as duas propriedades estão aparentemente associadas a diferentes fatores.

BRÜCHER *et alii* (1972) mostraram a existência de quatro diferentes tipos de lectinas, com base em testes de aglu

hamster tratado com pronase; b) feijões tipo B, contêm lectinas que aglutinam eritrócitos de coelho e de hamster tratado com pronase, mas não aglutinam eritrócitos bovinos tripsinizados; c) feijões tipo C, contêm lectinas que aglutinam só eritrócitos de hamster tratado com pronase e de bovino tratado com tripsina; d) feijões tipo D, contêm lectinas que aglutinam somente eritrócitos de hamster tratados com pronase. Testando estes grupos através de injeções intraperitoniais em ratos e camundongos, concluíram que os tipos A e C eram tóxicos, enquanto que os B e D não eram tóxicos.

JAFFÉ & BRÜCHER (1972) e JAFFÉ *et alii* (1972) também observaram que aquecendo os extratos de feijões dos tipos A e C, havia a eliminação da atividade hemaglutinante antes da toxicidade, quando eritrócitos de coelhos eram usados, e que somente havia coincidência destes fatos, quando utilizavam-se eritrócitos bovinos tripsinizados. Baseados nestas observações, estes autores, recomendaram que os testes com eritrócitos bovinos tripsinizados fossem usados para a detecção dos feijões tóxicos e para monitoramento da adequação do tratamento térmico para a eliminação da toxicidade da lectina de *Ph. vulgaris*.

Nesta mesma série de trabalhos, JAFFÉ & BRUCHER (1972) apresentaram a evidência da presença, nas sementes de um cultivar comercial de feijão-preto, 'Cubagua', de diferentes tipos de lectinas em que 24% das sementes eram do tipo A, contendo lectinas tóxicas e 76% do tipo B (não tóxicas). Estes diferentes tipos de lectinas podem ser separados por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose). A proporção de sementes com lectinas tóxicas e não tóxicas sugere que a herança para este

a um gene dominante, o que facilita a detecção deste fator em uma população de sementes, para sua eliminação através de programas de melhoramento.

Outra observação interessante, feita por JAFFÉ (1973) é de que as hemaglutininas tóxicas aparecem com maior intensidade nas variedades pigmentadas que nas brancas ou não pigmentadas.

LIMA *et alii* (1980) estudaram a atividade hemaglutinante mitogênica e propriedades tóxicas de 16 cultivares brasileiros de *Ph. vulgaris*. Todos os cultivares aglutinaram hemácias bovinas tripsinizadas ou de coelho e induziram mitose em cultura de linfócitos humanos com diferentes intensidades mas não mostraram atividades sobre eritrócitos bovinos não tripsinizados. Os extratos de vários feijões foram altamente tóxicos quando injetados intraperitonalmente em camundongos. As amostras tóxicas tiveram alta atividade aglutinante contra células vermelhas bovinas tripsinizadas e de coelhos e foram também altamente mitogênicas, entretanto, várias amostras com alta atividade mitogênica não foram tóxicas quando injetadas intraperitonalmente em ratos.

MANCINI FILHO & LAJOLO (1981) também estudaram a atividade fito-hemaglutinante de cultivares brasileiras de feijão (*Ph. vulgaris*) estabelecendo correlação entre esta atividade, face a hemáceas de diversos animais e a toxicidade, testada por injeções intraperitoniais em camundongos, verificando que um elevado título aglutinante para hemáceas de bovino correspondia a uma elevada toxicidade, o que permitiria classificar os cultivares de feijão em classes.

Com base nas suas atividades hemaglutinante e mitogênica, assim como em suas propriedades físicas, esta fração protéica foi julgada similar, se não idêntica, às lectinas previamente descritas em outras variedades de *Phaseolus vulgaris*.

A toxicidade de lectinas de feijões "kidney" tem sido exhaustivamente estudada por Pusztai e seus colaboradores (PUSZTAI *et alii*, 1975; PUSZTAI & PALMER, 1977). PUSZTAI *et alii* (1975) isolaram e caracterizaram parcialmente os constituintes tóxicos de um isolado protéico de feijão "kidney". Mostraram que as frações albumina e globulina eram tóxicas quando adicionadas à dieta de caseína, cujo conteúdo protéico era de 5%, sendo a fração albumina mais tóxica que a globulina. Eles identificaram lectinas em cada uma das duas frações e concluíram que a toxicidade estava diretamente relacionada ao título hemaglutinante destas duas frações. PUSZTAI & PALMER (1977) purificaram lectinas de feijão "kidney" (*Ph. vulgaris*) das duas frações protéicas, por cromatografia de afinidade em coluna de fetuína-sepharose 4B. A utilização protéica líquida (NPU), dos ratos alimentados com ração contendo 5% de caseína foi fortemente prejudicada pela adição das preparações de lectinas. Eles encontraram que a toxicidade estava diretamente relacionada ao conteúdo de lectina da dieta. Por outro lado, eles demonstraram que as preparações de feijão "kidney" isentos de lectina não eram tóxicos para ratos. Baseados nestes resultados eles sugeriram que o princípio tóxico do feijão "kidney" se identifica com as lectinas.

ANTUNES & SCARBIERI (1980) mostraram que a toxicidade do feijão cru (*Ph. vulgaris*, cv. Rosinha G2) estava asso

um grupo de 10) foi: farinha integral > albumina > globulina > resíduo insolúvel da extração da proteína. No mesmo trabalho eles reportaram a quantidade de calor necessária para eliminar a toxicidade das frações protéicas e dos grãos inteiros. Foi observado que o aquecimento a 97°C por 2-3 minutos, de feijões macerados em água, elevou o valor nutricional ao máximo, mesmo quando as atividades hemaglutinante e inibidora de proteases estavam presentes em níveis elevados.

SGARBIERI (1979) encontrou que a adição de lectinas isoladas de feijão 'Rosinha G2' a uma ração de caseína (10% de proteína) para ratos, prejudicou apreciavelmente a digestibilidade protéica e o crescimento dos animais, embora esta dieta não os matasse, como a ração contendo farinha integral. Eles também reportaram que a digestibilidade das frações protéicas isoladas foi maior que a da farinha integral e que a suplementação com aminoácidos sulfurados melhorou o valor biológico das frações protéicas isoladas mais eficientemente que da farinha integral.

Baseados nestes resultados foi sugerido que certos cultivares de feijão (*Ph. vulgaris*) contêm três classes de componentes tóxicos: a) um extremamente termo-lábil e fortemente tóxico de natureza não conhecida, que pode ser o responsável pela rápida morte dos animais; b) lectinas e outros compostos de toxicidade mediana que requerem longos tratamentos térmicos para sua destruição; c) compostos termo-resistentes de baixa toxicidade que contribuem para a baixa digestibilidade e o baixo valor nutritivo de certas variedades. Podem ser compostos fenólicos, ácido fítico, saponinas e alcalóides.

fito-hemaglutininas isoladas de grãos de feijão (*Ph. vulgaris*), dos cultivares Jalo e Rico-23, considerados como sendo tóxico e não tóxico, respectivamente, a rações de caseína com diferentes concentrações de proteína (5, 10 e 20%). Os resultados revelaram que todos os níveis de lectinas do feijão 'Jalo' provocaram diminuições significativas nos coeficientes de eficácia alimentar dos grupos com os menores teores protéicos em suas rações (5 e 10%) e diminuição na atividade das dissacaridases intestinais, as sim como no teor de glicose do soro, dos animais alimentados com qualquer dos níveis protéicos. As lectinas do 'Rico-23' provocaram diminuição no crescimento dos animais e nas atividades da maltase e da invertase, quando ao nível de 5%, enquanto que a 2% causaram apenas efeito discreto sobre o peso, mas variação significativa nas atividades destas enzimas e a 1% não provocaram qualquer efeito.

O mecanismo do efeito antinutricional das lectinas não está completamente conhecido, embora tenha sido foco de atenção de muitos pesquisadores. JAFFÉ (1960) propôs que o efeito tóxico das lectinas, quando ingeridas oralmente, pode ser causado pela sua habilidade em ligar-se a receptores específicos das células epiteliais da parede intestinal. Suporte para esta hipótese têm sido encontrado em estudos "in vivo" e "in vitro" com a absorção intestinal de vários nutrientes (JAFFÉ & CAMEJO, 1961; FIGUEROA *et alii*, 1981). Foi mostrado que as lectinas podem causar decréscimo na absorção intestinal de açúcares, lipídios e proteínas no rato. ETZLER & BRANSTATOR (1974) contribuíram com esta hipótese quando encontraram que diferentes lectinas reagem

profundos efeitos fisiológicos sobre as células com as quais interagem. Um destes efeitos pode ser um sério impedimento na habilidade destas células em absorver nutrientes do trato intestinal, causando, portanto, inibição de crescimento e, em casos extremos, a morte (HARA *et alii*, 1983; ROSSI *et alii*, 1984).

Sérios danos às células epiteliais do intestino e microvilosidades devido à ação das lectinas foi mostrado por microscopia ótica e eletrônica (PUSZTAI *et alii*, 1979a, b; ROSSI *et alii*, 1984). As lectinas reagem com as células intestinais "in vivo" e causam o rompimento de microvilosidades das células epiteliais (mucosa) do duodeno e do jejuno. Embora prejudicada em certa extensão, a absorção ainda pode ocorrer, provavelmente através das células não rompidas do intestino delgado. Em adição, absorção anormal de substâncias potencialmente perigosas pode ocorrer, como as próprias lectinas ou toxinas de origem bacteriana, como resultado do rompimento causado pelas lectinas aos epitélios. PUSZTAI *et alii* (1979a, b) também encontraram uma excreção de nitrogênio urinário muito alta em animais que recebiam dietas contendo lectinas ativas. Eles sugeriram que o efeito tóxico total das lectinas poderia ser devido a um desarranjo do metabolismo, iniciado com perturbação na absorção e seletividade da membrana biológica e aumento do catabolismo nos tecidos.

Alinhada com a teoria da absorção anormal de substâncias potencialmente perigosas que ocorre devido ao rompimento causado pelas lectinas nas membranas das células epiteliais, JAYNE-WILLIAMS (1973) e JAYNE-WILLIAMS & BURGESS (1974) observaram que codornizes japonesas "germ-free" foram mais resistentes aos efeitos tóxicos de feijão "navv" cru que aves convencionais

gerido (JAYNE-WILLIAMS & BURGESS, 1974) que a ligação das lectinas às células da mucosa intestinal podia interferir com as defesas naturais do organismo, desempenhadas por estas células. Na presença de lectinas, bactérias normalmente inócuas podem ir do lumen intestinal à linfa, sangue e outros tecidos do corpo, aumentando a toxicidade observada e decrescendo a resistência do animal, resultando em efeitos tóxicos.

Tem sido geralmente aceito que as lectinas são substâncias termo-lábeis, que são destruídas sob condições normais de preparo doméstico ou industrial de alimentos. Entretanto, alguns trabalhos (GRIEBEL, 1950; KORTE, 1972; ANÔNIMO, 1976) têm mostrado a atividade de lectinas em alimentos processados, o que pode ter sido responsável pelas intoxicações reportadas. KORTE (1972) encontrou atividade hemaglutinante em 22% das misturas preparadas com *Ph. vulgaris* e milho, preparadas e cozidas em condições das vilas africanas. Nestes casos, sinais de intoxicação, tais como vômitos, diarréia e má absorção, são frequentemente observados entre crianças consumidoras desta mistura. O mesmo autor menciona o descrito por GRIEBEL (1950), que em 1948, flocos de feijão foram distribuídos à população de Berlim, com a recomendação de cozimento por 15 minutos, quando os flocos eram aparentemente macios, para o consumo. Quando se observou uma intoxicação generalizada entre a população, concluiu-se que o tempo de cozimento não havia sido adequado para destruir todas as substâncias tóxicas dos feijões. Recentemente um caso de intoxicação humana por feijão 'Red Kidney' foi descrito na Grã-Bretanha (ANÔNIMO, 1976).

Devido à sua diversidade de propriedades tais como habilidade para combinar-se com...

do objeto de grande interesse por cientistas da área médica. De acordo com BOYD (1963) os seguintes usos de lectinas têm sido feitos em pesquisa básica e aplicada: a) determinação de sub-grupos sanguíneos dos grupos A e AB (BOYD & SHAPLEIGH, 1954a); b) diagnóstico de secretores salivares (BOYD & SHAPLEIGH, 1954b); c) Agrupamento do sangue em A, B e O (SAINT-PAUL, 1961); d) agrupamento Mn do sangue; e) separação de células A e O; f) estudos populacionais de caráter sanguíneo G4 (SCHWARZFISCHER & LEIBRICH, 1962); g) estimulação da mitose (HUNGERFORD *et alii*, 1959; NOWELL, 1969 a, b); h) pesquisa sobre o cancer (NUNGESTER & VAN HALSEMA, 1953); i) descoberta de novos animais doadores de imunossoro (LEVINE *et alii*, 1957); j) estudo de substâncias sanguíneas (MORGAN & WATKINS, 1956).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

Utilizaram-se neste trabalho, grãos de doze cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) distribuídos entre oito grupos conforme classificação adotada pela Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, que baseia-se no trabalho de ABRAHÃO (1960), quais sejam: Grupo Chumbinho ('Aroana' e 'Cara Suja'); Grupo Manteiga ('Jalo' e 'Goiano Precoce'); Grupo Carioca ('Carioca'); Grupo Mulatinho ('Piratã-1'); Grupo Preto ('Iguaçu' e 'Rico-23'); Grupo Bico de Ouro ('Aeté-1' e 'Aeté-3'); Grupo Rosinha ('Rosinha G2') e Grupo Roxo ('Roxinho') mostrados na Figura 1. Os campos, com os doze cultivares, foram especialmente conduzidos por técnicas da Seção de Leguminosas, sob idênticas condições de clima, solo e tratamentos culturais, e cultivados em uma só época (maio a julho/1980), na Estação Experimental de Campinas do Instituto Agronômico-Campinas-SP.

5.2. Preparo das Amostras

Farinha Integral de Feijão Cru

O feijão em grão, com cerca de 10% de umidade, foi moído até a granulometria de 70 mesh, em moinho de martelo (Lab. pulverizing Mill 5S2624). Para as análises que exigiram fi

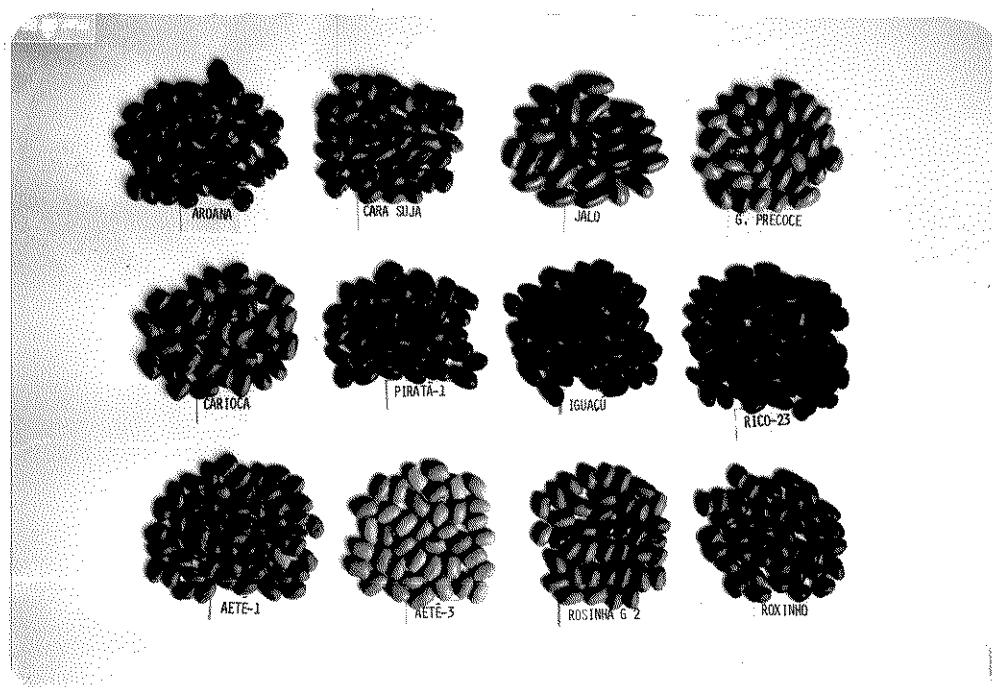


FIGURA 1 - Grãos dos cultivares de feijão utilizados no presente estudo.

nura ainda maior da amostra, esta farinha foi novamente moida em moinho de ciclone (Tecator, 1092 CYCLOTEC) até a finura de 90-100 mesh.

Farinha Integral de Feijão Autoclavado

Os grãos de feijão foram macerados em água destilada por 12 horas à temperatura ambiente, na relação 1:4 (p/v). Em seguida, os grãos foram autoclavados submersos em água, por 10 minutos, a 121°C. Após resfriamento rápido, estas amostras foram liofilizadas (LIOFILIZADOR VIRTIS, Mod. 10 - 146 MRB) e moídas em moinho de facas até a granulometria de 70 mesh.

5.3. Análises Químicas

Nas amostras devidamente preparadas foram feitas, em duplicata ou triplicata, as análises que se seguem, cujos valores médios aparecem em quadros e figuras na apresentação dos resultados.

Umidade

A umidade foi sempre determinada seguindo o método descrito pela AOAC (1970), no qual as amostras são levadas à estufa a 100-105°C até peso constante.

Extrato Etéreo

Determinou-se, segundo o método descrito pela AOAC (1970), utilizando-se o aparelho de extração de Goldfish.

Na extração usou-se como solvente éter de petróleo (p.e. 30-60°C) por 6 horas, com refluxo contínuo através da amostra.

Proteína

O teor protéico (%) foi sempre conseguido multiplicando-se o teor (%) de nitrogênio total pelo fator 6,25 (AOAC, 1965).

O conteúdo de N total foi determinado pelo método semi-microkjeldahl e para tal baseou-se na metodologia proposta pela AOAC (1965).

Carboidrato Total

O preparo das amostras para determinação do conteúdo de carboidratos totais foi feita conforme o método citado por KANESIRO *et alii* (1977).

O conteúdo de carboidratos dos hidrolisados obtidos foi sempre determinado pelo método de DUBOIS *et alii* (1956) e expresso com base em curva padrão de glicose.

Triptofânio

O conteúdo de triptofânio foi determinado pelo método colorimétrico de SPIES (1967), conforme proposição de AMAYA-FARFAN *et alii* (1977).

Aminoácidos Totais

O método utilizado nas determinações por cromatografia

grafia de troca iônica foi, em linhas gerais, o proposto por SPACKMAN *et alii* (1958), usando-se um Analisador Beckman 120 C. Seguiu-se, basicamente, as recomendações descritas no manual do aparelho para o preparo das amostras (BECKMAN INSTRUMENTS, 1966).

A determinação do conteúdo de aminoácidos por cromatografia gasosa foi feita conforme metodologia proposta por IRRMAN (1974). As amostras foram inicialmente hidrolisadas em tubos de ensaio herméticos, com HCl 6N contendo solução de 2-mercaptoetanol 1/100 na proporção 1:100 (p/v), por 22 horas a 110°C. Depois de evaporadas até secagem e filtração do hidrolisado em coluna Dowex-50-X (100-200 mesh) a solução de aminoácidos foi novamente evaporada até secagem, a 50°C em atmosfera de N₂. A derivatização das amostras tratadas com KCl-propanol a 110°C/40 min, foi feita com anidrido heptafluorbutírico e acetonitrila a 150°C por 5 minutos.

Após a derivatização injetou-se alíquota de 3 µl, em um cromatógrafo VARIAN 244055, com coluna 3% SE-30 em Chromosorb W-HP, 80-100 mesh (temperatura do injetor = 225°C; temperatura do detector = 280°C; programação de temperatura = 5-6°C/min de 75° a 250°C). O padrão interno utilizado foi a norleucina e o aparelho ajustado com padrão contendo todos os aminoácidos analisados, na concentração de 0,5 mg/ml.

Metionina

A avaliação do conteúdo de metionina foi feita através da dosagem do metiltiocianato liberado pela reação da metionina com o brometo de cianogênio, conforme o proposto por APOSTOLATOS & HOFF (1981) e baseiam-se na especificidade e no comportamento estequiométrico, dentro da relação 1:1, da reação do brometo de cianogênio (BrCN), com os resíduos intactos de me

tionina na proteína e consequente liberação do metiltiocianato que é determinado por cromatografia gasosa (ELLINGER, 1978).

O metiltiocianato foi quantificado após a reação de quantidade suficiente de farinha de feijão cru (40 - 50 mg) com 700 µl de solução de CNBr 1,145% (p/v) em ácido fórmico 70% e 100 µl da solução de etiltiocianato 0,4% (padrão interno) em ácido fórmico 70%, incubação a 95°C/60 minutos, centrifugação a 3000xG/5 min e aplicação de 2 µl do sobrenadante em cromatôgrafo a gás (VARIAN, mod. 1440) equipado com detector de ionização de chama e coluna de vidro (90 cm x 0,2 mm) silanizada preenchida com Porapak Q5,80-100 mesh (Waters Associates, Inc., Milford, Mass., USA). As condições de trabalho foram: temperatura da coluna = 160°C, temperatura do detector = 225°C, fluxo de ar = 300 ml/min, fluxo de hidrogênio = 30 ml/min e fluxo de nitrogênio = 30 ml/min.

A quantificação da metionina presente nos grãos dos feijões foi feita utilizando-se curva padrão cuja abcissa representava a concentração de DL-metionina, expressa em microgramas e a ordenada, a relação entre as áreas dos picos de metiltiocianato e etiltiocianato (padrão interno), registradas pelo cromatôgrafo. O coeficiente de correlação entre estes parâmetros foi da ordem de 0,991 e a reta apresentou a equação:

$$Y = 0,0185 + 0,0017 X$$

A eliminação do glutamyl-S-metilcisteína das amostras foi feita conforme o proposto por McINTOSH & ELLINGER (1976) e constou de agitação da amostra por 2 horas em etanol 70%, filtração e secagem da farinha por liofilização.

Fracionamento Protéico

O fracionamento protéico foi feito conforme o pro

posto por SGARBIERI (1979) no qual as proteínas são extraídas da farinha integral do feijão cru, fazendo-se a agitação da mesma por 2 horas em solução de NaCl 0,2M, a 24°C, na proporção farinha/solvente = 1/5 (p/v). Seguiu-se uma centrifugação (12000xG 30 min., 5-10°C) em centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B. O resíduo da primeira extração foi re-extraído, com o mesmo solvente nas mesmas condições. A combinação dos sobrenadantes das diferentes extrações, após centrifugação, constituiu o extrato bruto.

O extrato foi submetido a uma diálise em água destilada (4°C, 48-72 h), utilizando-se membranas de celulose (Sigma Chemical Co., A. Thomas Co.) com capacidade de excluir substâncias com pesos moleculares até 8.000. A centrifugação (12.000 xG, 4°C, 30 min) das suspensões após a diálise resultou em um precipitado (globulinas) e uma fração sobrenadante (albuminas). A liofilização das frações protéicas, permitiu que as mesmas fossem conservadas e utilizadas para as análises posteriores.

Taninos

Taninos totais foram estimados pelo método de JOSLYN (1970).

Enxofre Total

O conteúdo de enxofre total foi determinado por turbidimetria, conforme metodologia proposta por TABATABAI & BREMMER (1970).

Nitrogênio Não Protéico

Determinado conforme o descrito pelo método de BECKER *et alii* (1940), no qual o nitrogênio protéico é precipitado com ácido tricloroacético 10% e o nitrogênio não protéico determinado no sobrenadante (método de Kjeldahl - AOAC, 1965), após repouso e filtração.

Ácidos Nucléicos

A extração foi feita conforme procedimento de Schneider (1945) indicado e modificado conforme metodologia descrita por WEBB & LEVY (1958). Baseia-se na absorção característica de luz ultravioleta pelos componentes purínicos e pirimidínicos das moléculas de ácido nucléico e expresso em termos do coeficiente de extinção, em relação ao fósforo, definido por Chargaff & Zamenhof (1948). O comprimento de onda utilizado foi de 268,5 nm, no qual este coeficiente de extinção tem o mesmo valor, 9850, para o DNA e para o RNA.

5.4. Análises Bioquímicas

Atividade do Inibidor da Tripsina

Foi determinada utilizando-se basicamente o método original de KUNITZ (1947), que emprega caseína como substrato e leitura espectrofotométrica à 280 nm dos aminoácidos liberados na hidrólise, em função de uma concentração de tripsina. Utilizou-se nestas determinações as modificações introduzidas por KA

KADE *et alii* (1969a) e por ANTUNES (1979).

Levando-se em conta a definição de unidade de tripsina (UT) como sendo o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 280 nm nas condições do teste, calculou-se as unidades de tripsina inibidas (UTI) pela diferença entre as unidades de tripsina totais (UT) da atividade máxima e as da amostra contendo o inibidor (UTI).

Atividade Hemaglutinante

Empregou-se, fundamentalmente, o método descrito por LIENER (1955) que baseia-se na grande sensibilidade de aglutinação dos eritrócitos bovinos tripsinizados, quando em presença de hemaglutinina. Neste trabalho, utilizou-se as modificações propostas por JUNQUEIRA & SGARBIERI (1981) e definiu-se o título hemaglutinante como sendo a maior diluição, capaz de promover aglutinação (+) nas condições do ensaio, ajustando-se a concentração inicial do extrato 1 mg de proteína/ml. A atividade hemaglutinante total representa o título/g de amostra.

Os extratos protéicos para o título de hemaglutinação, foram preparados conforme o descrito por JAFFÉ & BRÜCHER (1972).

5.5. Ensaio Biológicos

Na avaliação da qualidade nutricional e/ou do efeito tóxico das proteínas das diferentes amostras, realizou-se balanços metabólicos, assim como determinou-se o quociente protéico líquido (NPR), a digestibilidade aparente e/ou "verdadeira", a disponibilidade de metionina, a variação de peso dos animais e o con

sumo de proteína, utilizando-se ratos em crescimento da linhagem Wistar. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração "ad libitum". Em todos os ensaios, a caseína foi usada como proteína padrão.

Preparo das Dietas

Na realização dos ensaios biológicos, foram preparadas dietas cuja composição centesimal está basicamente especificada em ALLISON (1964) e FRIEDMAN (1975), assim como pela AOAC (1975). As proporções usadas estão representadas no Quadro 1, sendo que a composição da mistura mineral utilizada foi a especificada por ROGERS & HARPER (1965) e a mistura vitamínica foi baseada no trabalho de WARNER (1962), sobre as exigências mínimas do rato em crescimento e na composição da mistura vitamínica da Nutritional Biochemicals Corporation (NBC), Cleveland, Ohio, EUA, especificadas no ICN Diet Catalog, 1977 e 1978.

QUADRO 1 - Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.

Componentes	Porcentagens
Proteína (amostras)	10
Gordura (óleo de milho comercial)	8
Sais minerais ^{a/}	4
Vitaminas ^{b/}	2
Sacarose (açúcar refinado comercial)	1/3 do peso para 100
Amido (amido de milho comercial)	2/3 do peso para 100

a/ Mistura salina preparada conforme ROGERS & HARPER (1965).

b/ Mistura vitamínica preparada conforme o ICN Diet Catalog (NBC, 1977 e 1978).

Quociente Protéico Líquido (NPR)

Na avaliação do índice NPR empregou-se o método descrito por BENDER & DOELL (1957) e utilizou-se ratos de ambos os sexos (60% ♀ e 40% ♂), com idade de 23 a 28 dias (45-50 g) no início do ensaio. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração "ad libitum", pelo período de 10 dias. Além dos grupos que receberam as rações com as proteínas em estudo, empregaram-se sempre os grupos controle em dieta aprotéica e de caseína. Durante o ensaio foram controlados os ganhos de peso dos animais, assim como as quantidades de ração consumida. Fim do período estabelecido, o índice NPR foi calculado pela relação:

$$\text{NPR} = \frac{\text{GP}_{\text{teste}} + \text{PP}_{\text{aprot.}}}{\text{P}_{\text{ing}}}$$

GP_{teste} = ganho de peso do grupo alimentado com a ração contendo a proteína em estudo.

$\text{PP}_{\text{aprot.}}$ = perda de peso do grupo alimentado com a ração aprotéica.

$\text{P}_{\text{ing.}}$ = proteína em estudo, ingerida.

Digestibilidade

A determinação deste parâmetro sempre foi feita durante os diversos ensaios biológicos levados a efeito. A digestibilidade aparente das proteínas foi estimada tendo-se por base a determinação do nitrogênio total ingerido e o eliminado nas fezes. O cálculo foi feito pela relação:

$$\text{Digestibilidade}_{\text{ap.}} (\%) = \frac{N_{\text{ing}} - N_{\text{fezes}}}{N_{\text{ing}}} \times 100$$

N_{ing} = nitrogênio total ingerido com a ração.

N_{fezes} = nitrogênio total eliminado nas fezes.

A digestibilidade "verdadeira" das proteínas pode ser estimada com base na determinação do nitrogênio total eliminado nas fezes pelo grupo de ratos alimentados com ração aprotéica, além das determinações feitas para o cálculo da digestibilidade aparente. O cálculo foi feito pela relação:

$$\text{Digestibilidade}_{\text{verdadeira}} (\%) = \frac{N_{\text{ing}} - N_{\text{fezes}} + N_{\text{fezes aprot.}}}{N_{\text{ing}}} \times 100$$

$N_{\text{fezes aprot.}}$ = nitrogênio total eliminado nas fezes pelo grupo em dieta aprotéica.

Biodisponibilidade da Metionina

Na avaliação da disponibilidade biológica da metionina usou-se o procedimento da adição desse aminoácido em níveis crescentes nas dietas elaboradas com o feijão autoclavado e preparadas segundo a composição centesimal mostrada no Quadro 1. Para o estudo da biodisponibilidade da metionina, as dietas foram enriquecidas com 0,9% de cisteína e com concentrações crescentes de metionina, em relação ao conteúdo protéico (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,7; 1,4; 2,1%). Os ensaios foram realizados com ratos nas mesmas condições dos testes de NPR, mantidos individualmente em gaiolas com ração e água "ad libitum", por 10 dias, findo o que se estimou a biodisponibilidade da metionina em função da curva

de crescimento dos ratos e do conhecimento do conteúdo de metionina das amostras.

Balanços Metabólicos

Os balanços metabólicos, que possibilitaram a determinação do valor biológico das proteínas, foram levados a efeito utilizando-se ratos, os quais foram individualmente mantidos em gaiolas metabólicas, o que possibilitou a avaliação do consumo protéico e a coleta das fezes eliminadas e da urina excretada.

Os animais receberam a ração com a fonte protéica em estudo e água "ad libitum". A coleta de fezes e urina, assim como o controle da ração consumida foram sempre feitas pelo período de três dias, após os animais terem se adaptado à ração por um período de 3-5 dias.

O valor biológico (VB) foi calculado pela relação:

$$VB(\%) = \frac{N_{ing} - (N_{fezes} - N_{fezes\ aprot.}) - (N_{urina} - N_{urina\ aprot.})}{N_{ing} - (N_{fezes} - N_{fezes\ aprot.})} \times 100$$

N_{urina} = nitrogênio total eliminado na urina.

$N_{urina\ aprot.}$ = nitrogênio total eliminado na urina, pelo grupo aprotéico.

Os balanços metabólicos também permitiram o cálculo da utilização líquida da proteína (NPU), pela relação:

$$NPU(\%) = \frac{N_{ing} - (N_{fezes} - N_{fezes\ aprot.}) - (N_{urina} - N_{urina\ aprot.})}{N_{ing}} \times 100$$

Efeito Tóxico

O efeito tóxico para ratos, dos diferentes cultivares de feijão, foi avaliado fazendo-se, além das determinações descritas, a avaliação das tendências das curvas de crescimento dos animais e do consumo de ração. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam água e ração "ad libitum". Durante o tempo de duração dos mesmos, os ratos foram alimentados com rações cuja fonte protéica era a farinha integral do feijão cru ou misturas desta farinha com caseína, em partes iguais ou diferentes, mantendo-se o nível de 10% para a proteína das rações. As misturas de caseína e farinha de feijão cru foram sempre feitas em base protéica.

5.6. Cortes Histológicos

Os cortes histológicos de intestinos delgados foram feitos conforme o recomendado por BARKA & ANDERSON (1963) e sempre constou da retirada do órgão, fixação do mesmo em formol 10% por 48 horas; desidratação (tratamento por 2 horas suçessivamente, com solução de álcool etílico 70%, 80%, 90%, 96%, seguido de tratamento com álcool etílico absoluto por 2 horas, por três vezes e com a mistura álcool etílico absoluto: benzol 1:1, também por 2 horas); clarificação (tratamento, por três vezes, com benzol por 1 hora); impregnação por duas horas em parafina a 56°C, por três vezes; inclusão em parafina; apara do bloco; microtomia e montagem do corte em lâmina. A seguir o corte foi desparafinado com tratamento por 10 minutos em xilol por três vezes e hidratado por 10 minutos com álcool etílico absoluto por três vezes, e sucessivamente, com álcool etílico 96%,

90%, 80%, 70% e água destilada.

O corte desparafinado e hidratado foi colorido por 20 minutos em solução de azul de toluidina 0,01%, tamponado com ácido cítrico 0,025M e fosfato dissódico 0,05M, pH 4,0; lavado por 10 segundos na solução tampão descrita, agitando-se vagarosamente a lâmina; imersão em álcool butílico terciário, com agitação vigorosa por 15-30 segundos; tratamento com xilol por 3 minutos e montagem em resina neutra.

6. RESULTADOS

6.1. Composição Centesimal

O Quadro 2 apresenta a análise centesimal da farinha integral dos grãos de feijão, dos doze cultivares estudados, onde tem-se que os conteúdos protéicos variaram de 23,01 (Carioca) a 29,00 g/100 g (Aroana) (média = 26,02 e desvio padrão = 1,89), os de extrato etéreo de 1,03 (Aetê-3) a 1,59 g/100 g (Cara Suja) (média = 1,29 e desvio padrão = 0,16), os de carboidratos de 57,4 (Aroana) a 69,7 g/100 g (Carioca) (média = 63,6 e desvio padrão = 3,72) e os de cinza de 3,67 (Carioca) a 5,11 g/100 g (Rico-23) (média = 4,39 e desvio padrão = 1,24). Os valores apresentados no Quadro 2 mostram que nenhum dos cultivares estudados foge à composição centesimal típica, já descrita para grãos de feijão, seja pelo conteúdo protéico e de cinza, pelos baixos valores dos extratos etéreos e pelos valores relativamente altos para os carboidratos, em concordância com os reportados nas revisões de ZUCAS *et alii* (1971) e TOBIN & CARPENTER (1978).

O conteúdo de enxofre total variou de 0,12 ('Jalo') a 0,27 g/100 g ('Aetê-3') (média = 0,22 e desvio padrão = 0,048).

QUADRO 2 - Conteúdo de proteína, extrato etéreo, carboidrato, cinza e enxofre, da farinha integral dos grãos de feijão dos cultivares estudados.

Cultivar	Proteína ¹	Extrato etéreo ¹	Carboidrato ²	Cinza ¹	Enxofre ¹
Aroana	29,00 (0,96)	1,32 (0,09)	57,4 (0,53)	4,12 (0,06)	0,23 (0,017)
Cara Suja	28,18 (0,73)	1,59 (0,06)	65,2 (1,04)	4,47 (0,23)	0,19 (0,017)
Jalo	26,55 (0,56)	1,47 (0,10)	68,6 (0,69)	3,99 (0,32)	0,12 (0,010)
G. Precoce	26,77 (0,70)	1,25 (0,10)	64,1 (1,05)	3,89 (0,12)	0,18 (0,020)
Carioca	23,01 (0,72)	1,35 (0,07)	69,7 (1,13)	3,67 (0,28)	0,25 (0,017)
Piratã-1	27,39 (0,67)	1,28 (0,05)	67,5 (0,95)	4,54 (0,05)	0,18 (0,010)
Iguaçu	27,22 (0,26)	1,31 (0,03)	60,7 (1,48)	4,75 (0,13)	0,16 (0,017)
Rico-23	24,45 (0,64)	1,06 (0,07)	60,7 (0,87)	5,11 (0,27)	0,26 (0,010)
Aetê-1	26,18 (0,84)	1,09 (0,05)	60,7 (0,78)	5,10 (0,12)	0,26 (0,020)
Aetê-3	25,03 (0,05)	1,03 (0,09)	65,2 (0,56)	4,12 (0,16)	0,27 (0,017)
Rosinha G 2	23,07 (0,36)	1,39 (0,10)	61,9 (1,25)	4,28 (0,10)	0,25 (0,017)
Roxinho	25,45 (0,57)	1,33 (0,04)	61,9 (1,01)	4,97 (0,56)	0,24 (0,010)

¹ Resultados expressos em g/100g de matéria seca.

² Resultados expressos em g (equivalente a amido)/100g de matéria seca.

OBS: Os números entre parênteses são os desvios padrões em relação à média apresentada.

6.2. Conteúdo de Taninos e Atividades Antitritíptica e Hemaglutinante

No Quadro 3 são apresentados os conteúdos de taninos totais, os quais variaram de 5,36, para o cultivar Piratã-1, a 10,16 mg/g para o Iguazú (média = 8,43 e desvio padrão = 1,42).

Deve-se observar que os teores de taninos totais não mostraram qualquer relação com a coloração da casca dos grãos.

A atividade antitritíptica dos grãos de feijão, também mostrada pelo Quadro 3, apresentou média de $26,0 \times 10^3$ UTI/g de amostra, em que o maior valor encontrado foi para o cultivar Piratã-1 ($37,9 \times 10^3$ UTI/g de amostra) e o menor para o Goiano Precoce ($13,4 \times 10^3$ UTI/g amostra), enquanto que para a atividade hemaglutinante total (título/g amostra) os valores estiveram entre $6,5 \times 10^3$ ('Carioca') e $456,4 \times 10^3$ ('Piratã-1'). Observa-se que a variabilidade existente entre os cultivares estudados para estas duas atividades antinutricionais, é bastante alta.

6.3. Toxicidade Relativa dos Cultivares

6.3.1. Experimento com 10% de proteína de feijão

O Quadro 4 mostra a toxicidade, para ratos Wistar, das rações contendo 10% de proteína, fornecida pela farinha integral preparada a partir de grãos crus dos cultivares estudados. Pode-se observar que todos os cultivares provocaram a morte dos animais num período que variou, em média, de 3,8 (Goiano Precoce) a 8,4 dias (Aroana). Ainda no Quadro 4 são mostrados também os resultados referentes às quantidades de proteína ingerida e de nitrogênio

QUADRO 3 - Conteúdo de taninos e atividades antitritíptica e hema
glutinante da farinha integral de grãos de feijão dos cultivares
estudados.

Cultivar	Taninos (mg/g)	Atividade antitritíptica ¹ (UTI x 10 ⁻³)	Atividade hemaglutinante ² (AHG x 10 ⁻³)
Aroana	7,91 (0,214)	33,3	105,1
Cara Suja	8,25 (0,108)	27,2	6,7
Jalo	9,96 (0,517)	24,5	260,9
G. Precoce	9,77 (0,234)	13,4	198,5
Carioca	7,60 (0,506)	19,1	6,5
Piratã-1	5,36 (0,078)	37,9	456,4
Iguaçu	10,16 (0,161)	29,8	200,9
Rico-23	8,46 (0,118)	39,3	12,1
Aetê-1	8,77 (0,212)	20,3	13,6
Aetê-3	6,98 (0,078)	25,0	7,0
Rosinha G 2	9,90 (0,733)	22,5	51,1
Roxinho	8,06 (0,082)	20,2	6,6

¹ Atividade antitritíptica = Unidade de atividade antitritíptica (UTI)/g de amostra.

² Atividade hemaglutinante total (AHG) = título/g de amostra.

OBS: Os números entre parênteses são os desvios padrões dos resultados em relação à média apresentada.

nio absorvido e eliminado nas fezes, assim como a perda de peso e a relação perda de peso/proteína ingerida (índice de toxidez da proteína).

Os dados apresentados permitiram calcular que quanto maior o índice de toxidez da proteína menor foi o número de dias que os animais resistiram vivos ($r = -0,895^{**}$).

As rações utilizadas foram tanto mais tóxicas quanto maior a atividade hemaglutinante das farinhas dos feijões

QUADRO 4 - Resultados obtidos em ensaio biológico com ratos Wistar, alimentados com ração contendo 10% de proteína, fornecida por farinha integral dos grãos crus dos cultivares estudados.

Cultivar	Proteína ingerida (g)	Nitrogênio absorvido ¹ (g)	Nitrogênio fecal (g)	Perda peso (g)	PP/PI ²	nº dias vivo ³ (média)
Aroana	11,75	0,29	1,59	66,5	5,65	8,4 (07 a 12)
Cara Suja	13,31	0,03	2,10	56,0	4,20	8,0 (06 a 10)
Jalo	8,25	0,04	1,28	54,5	6,61	5,0 (03 a 07)
G. Precoce	4,81	-0,44	1,21	50,0	10,44	3,8 (02 a 06)
Carioca	8,62	-0,18	1,56	48,5	5,60	6,6 (06 a 10)
Piratã-1	6,00	-0,04	0,92	60,5	10,12	4,6 (03 a 06)
Iguaçu	7,37	0,01	1,17	62,0	8,41	4,8 (03 a 07)
Rico-23	15,37	0,39	2,07	61,5	3,99	8,0 (04 a 13)
Aetê-1	12,00	-0,04	1,96	60,5	5,04	7,8 (03 a 11)
Aetê-3	12,87	0,16	1,90	49,5	3,83	7,6 (04 a 13)
Rosinha G 2	12,50	0,18	1,82	62,0	4,96	7,8 (06 a 12)
Roxinho	10,56	0,04	1,65	56,0	5,29	6,4 (06 a 08)

¹ Nitrogênio absorvido = nitrogênio ingerido - nitrogênio fecal.

² PP/PI = Perda de peso (g)/Proteína ingerida (g).

³ Os valores entre parenteses indicam o intervalo de tempo em que ocorreu o início e o término da mortalidade dos animais em cada dieta.

Os animais utilizados eram de 05 animais, com peso médio inicial de 225 g.

crus (Figura 2), pois esta atividade correlacionou-se diretamente com a toxidez das rações ($r = 0,840^{**}$) e indiretamente com o número de dias que os animais resistiram com vida na ração tóxica ($r = -0,751^{**}$).

Não foram encontradas correlações significativas entre atividade antitriptica ou conteúdo de taninos com o índice de toxidez ou número de dias vivos. O conteúdo de taninos também não afetou, significativamente ($r = -0,186^{ns}$), a absorção de nitrogênio. Por outro lado, a atividade antitriptica, ao contrário do que se poderia esperar, apresentou uma correlação positiva ($r = 0,746^{**}$) em relação à absorção de nitrogênio.

As correlações calculadas a partir dos dados do Quadro 4 parecem mostrar, claramente, que: a) as lectinas são as proteínas tóxicas responsáveis pelo maior ou menor índice de toxidez da proteína no feijão cru e, provavelmente, contribuem para a morte dos ratos em maior ou menor espaço de tempo; b) que a atividade antitriptica não está correlacionada com o índice de toxidez da proteína nem tampouco com o período de sobrevivência dos ratos; c) que a atividade antitriptica não prejudicou a absorção de nitrogênio pelos ratos constatando-se, ao contrário, uma maior absorção de nitrogênio nos cultivares com atividade antitriptica mais elevada. Isto sugere que a presença de inibidores de tripsina e de quimotripsina na dieta estimula o pâncreas a uma maior produção de enzimas, que poderia explicar a maior absorção de nitrogênio; d) em relação aos taninos, embora fosse esperada uma correlação negativa entre o conteúdo de taninos e a absorção de nitrogênio, essa correlação não foi significativa. Isto, talvez, possa ser explicado pelo conteúdo relativamente baixo de taninos, em todos os cultivares estudados.

Como as dietas com 10% de proteína, fornecida por

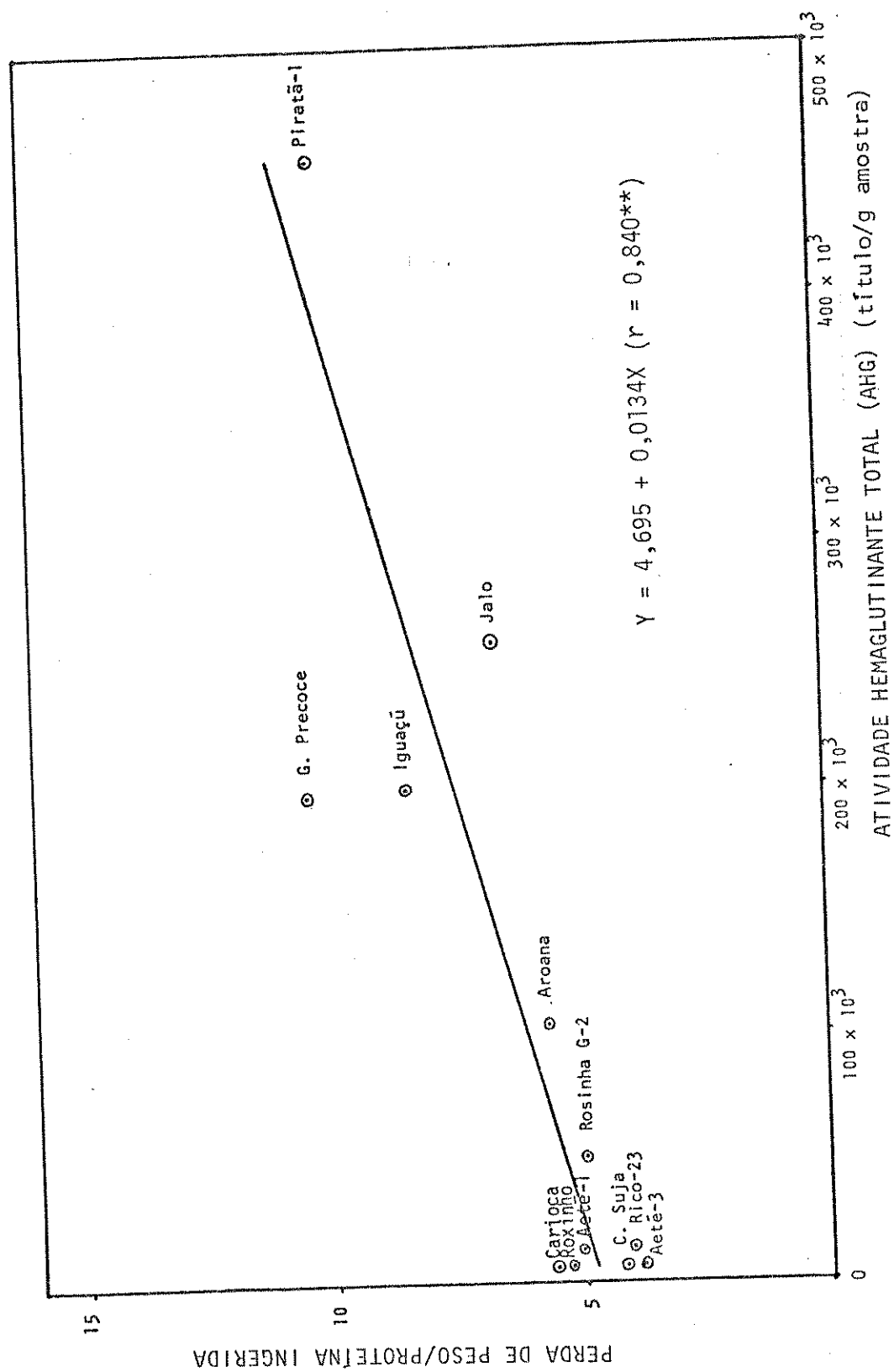


FIGURA 2 - Índice de toxidez da proteína (perda de peso/proteína ingerida) em relação à atividade hemaglutinante total, dos cultivares estudados.

farinha integral preparada a partir de grãos crus provocaram a morte de todos os ratos num período que variou, em média, de 3,8 a 8,4 dias para os diferentes cultivares, procedeu-se a um segundo ensaio em que 5% da proteína da dieta era proveniente de grãos crus de um dos cultivares de feijão e os outros 5%, da caseína.

6.3.2. Experimento com 5% de proteína de feijão + 5% de caseína.

Neste experimento, grupos de cinco ratos, com peso médio individual de 45,0 g, foram alimentados com ração, cujo conteúdo protéico (10%) foi fornecido por caseína (5%) e farinha integral de feijão cru (5%), procurando-se com este ensaio diferenciar os efeitos tóxicos das farinhas provenientes dos vários cultivares, uma vez que a diluição com caseína possibilitaria a observação deste efeito com menor ou mesmo sem mortalidade dos animais. Os resultados da variação de peso dos grupos, em função da duração do experimento, com determinações no quarto, oitavo e décimo segundo dias, são representados graficamente na Figura 3. Os valores numéricos da variação de peso e do consumo de proteína são mostrados no Quadro 5, assim como do índice de toxidez da proteína (perda de peso/proteína ingerida). Ainda no Quadro 5, são mostrados os valores de absorção e excreção fecal de nitrogênio, correspondentes aos 12 dias de experimentação, os quais permitiram o cálculo da digestibilidade da proteína em cada dieta.

Neste ensaio observou-se, como era esperado, correlação negativa entre a quantidade de proteína ingerida e a perda de peso aos quatro ($r = -0,860^{**}$), oito ($r = -0,748^{**}$) e doze dias ($r = -0,795^{**}$). Estas correlações permitem afirmar que quanto maior o índice de toxidez das proteínas dos vários cultiva

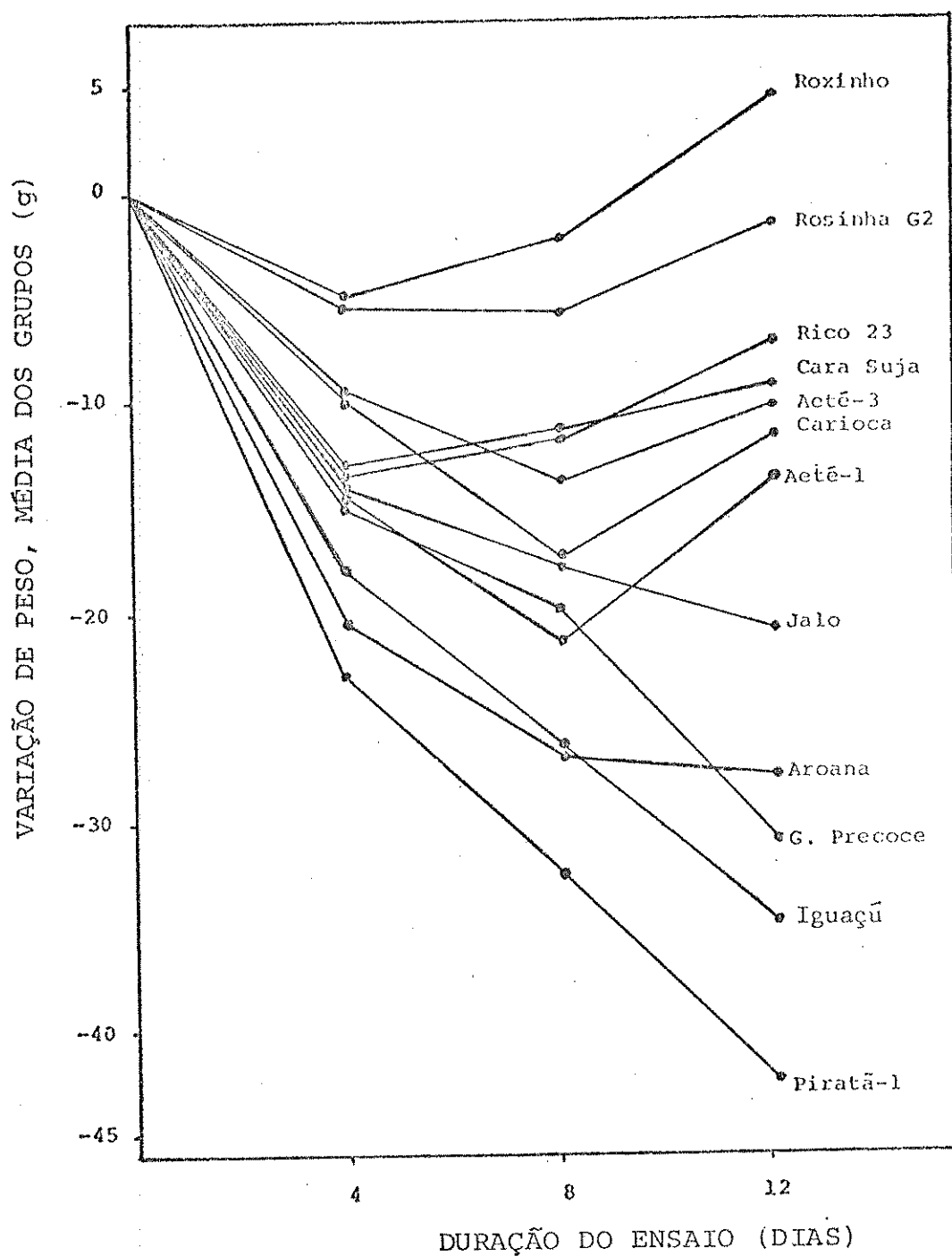


FIGURA 3 - Curvas de crescimento de ratos albinos Wistar, quando alimentados com rações cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por farinha integral de feijão cru (5%) e por caseína (5%).

OBS: Utilizou-se grupos de cinco animais, com peso médio inicial de 225 g.

QUADRO 5 - Resultados obtidos em ensaio biológico com ratos Wistar, alimentados com a ração contendo 10% de proteína, fornecida por caseína (5%) e farinha integral de feijão cru (5%), dos cultivos estudados.

res estudados.

Cultivar	40 Dia			80 Dia			120 Dia					
	Perda peso (g)	Prot. ing. ¹ (g)	PP/PI ³	Perda peso (g)	Prot. ing. ¹ (g)	PP/PI ³	Perda peso (g)	Prot. ing. ¹ (g)	N. fecal (g)	N. 2 abs. (g)	2 PP/PI ³	4 Dig. (%)
Aroana	20,5	5,9	3,44	20,5	12,1	1,69	28,0	18,6	1,76	1,21	1,51	53,6
Cara Suja	13,0	7,5	1,74	13,0	15,9	0,82	9,5	23,0	1,94	1,74	0,41	57,5
Jalo	14,0	6,8	2,07	18,0	13,9	1,29	21,0	20,9	1,69	1,65	1,01	60,7
G. Precoce	15,0	7,0	2,14	20,0	14,5	1,38	30,5	21,0	2,03	1,33	1,45	51,0
Carioca	10,0	7,3	1,38	17,5	14,5	1,20	12,0	21,1	1,90	1,87	0,57	54,9
Piratã-1	23,0	5,2	4,42	32,5	13,5	2,41	42,5	19,6	1,70	1,43	2,17	57,8
Iguaçu	18,0	6,8	2,65	26,5	13,8	1,92	35,0	20,5	1,72	1,56	1,71	59,1
Rico-23	13,5	8,3	1,62	13,0	16,9	0,77	7,5	25,1	1,79	2,23	0,30	65,0
Aetê-1	14,5	7,5	1,94	21,5	13,1	1,64	14,0	20,9	1,76	1,59	0,67	58,9
Aetê-3	9,5	7,1	1,33	14,0	14,4	0,97	10,5	21,7	1,79	1,69	0,48	59,6
Rosinha G 2	5,5	8,6	0,64	6,0	16,6	0,36	2,0	24,7	1,85	2,10	0,08	62,7
Roxinho	5,0	8,3	0,60	2,5	16,3	0,15	- 4,0	23,7	1,86	1,94	-0,17	61,0

¹ O valor indicado como proteína foi obtido pelo produto: N total (g) x 6,25; ² Nitrogênio absorvido = nitrogênio ingerido - nitrogênio fecal; ³ PP/PI = Perda de peso (g)/Proteína ingerida (g); ⁴ Digestibilidade (%) = [(N ing. - N fecal + N fezes aprotético)/N ing.] x 100.

OBS: Utilizou-se grupos de cinco animais, com peso médio inicial de 225 g.

res, maior será a perda de peso dos animais e menor a ingestão protéica, esta última em decorrência da diminuição da massa corporal e, talvez, do efeito tóxico.

A digestibilidade das proteínas das rações utilizadas neste ensaio variou entre 51,0-65,0%, o que evidencia o baixíssimo aproveitamento das proteínas das farinhas integrais de feijões crus, uma vez que a caseína utilizada apresentou digestibilidade de 90%.

Encontrou-se, novamente, correlações positivas entre a atividade hemaglutinante dos cultivares e a perda de peso pelos animais ($r = 0,692^{**}$, $r = 0,728^{**}$ e $r = 0,835^{**}$ no quarto, oitavo e décimo segundo dias, respectivamente). Foi também positiva a correlação entre esta atividade e o índice de toxidez da proteína ($r = 0,779^{**}$, $r = 0,718^{**}$ e $r = 0,836^{**}$ no quarto, oitavo e décimo segundo dias, respectivamente).

A atividade antitriptica, assim como o conteúdo de taninos não mostraram correlação significativa com a digestibilidade, com a relação perda peso/proteína ingerida ou com a perda de peso dos animais.

A Figura 3 mostra que as curvas de crescimento dos ratos, para os cultivares Piratã-1, Iguaçu, Goiano Precoce, Aroana e Jalo revelaram perdas de peso durante todo o ensaio, enquanto que as curvas dos cultivares Aeté-1, Carioca, Aeté-3, Cara Suja, Rico-23, Rosinha G2 e Roxinho mostraram que os animais depois do quarto dia de ensaio (Roxinho, Cara Suja e Rico-23) ou do oitavo dia (Rosinha G2, Aeté-3, Carioca e Aeté-1) tiveram uma recuperação no ganho de peso, resultado de uma possível adaptação de seus organismos. Este fenômeno fica também evidente pela análise dos índices de toxidez (Quadro 5) em que, apesar do consumo ter permanecido estável para todos os cultivares, durante

todo o ensaio, os valores do índice de toxidez da proteína ca
ram ao longo do tempo, para todos os cultivares, indicando que
os animais parecem ter se adaptado, parcialmente, aos efeitos tô
xicos da proteína, com o passar do tempo.

6.3.3. Experimento com proporções variáveis de feijão e de caseína

Tendo-se as observações feitas durante os ensaios
já relatados nos Quadros 4 e 5 e Figura 3, foi realizado um en
saio com 45 dias de duração, durante o qual os animais receberam
dietas com 10% de proteína, em três fases, ou seja: Fase I, 0 ao
16º dia (2,5% de proteína de feijão cru + 7,5% de caseína); Fase
II, 16º ao 34º dia (5,0% de proteína de feijão cru + 5,0% de ca
seína) e, Fase III, 34º ao 45º dia (10% caseína). Utilizou-se
neste ensaio somente três cultivares, quais sejam: Piratã-1, que
apresentou-se nos ensaios anteriores como sendo um dos mais tô
xicos; Roxinho, que foi um dos menos tóxicos e Rosinha G2, de
toxidez intermediária. Concomitantemente aos grupos de ratos Wis
tar alimentados com rações contendo farinhas destes cultivares,
como fonte protéica, nas proporções especificadas, foram conduzi
dos outros dois grupos (controles), sendo um alimentado com ra
ção cujo conteúdo protéico (10%) era integralmente suprido por
caseína e outro com dieta aprotéica.

As variações de peso e o aproveitamento da proteíu
na apresentados pelos animais submetidos às diferentes rações e
durante as três fases deste experimento são apresentados nas Fi
guras 4, 5, 6 e 7 e Quadro 6.

As Figuras 4 e 5 mostram que na Fase I, o cresci
mento dos animais alimentados com as rações contendo farinha de

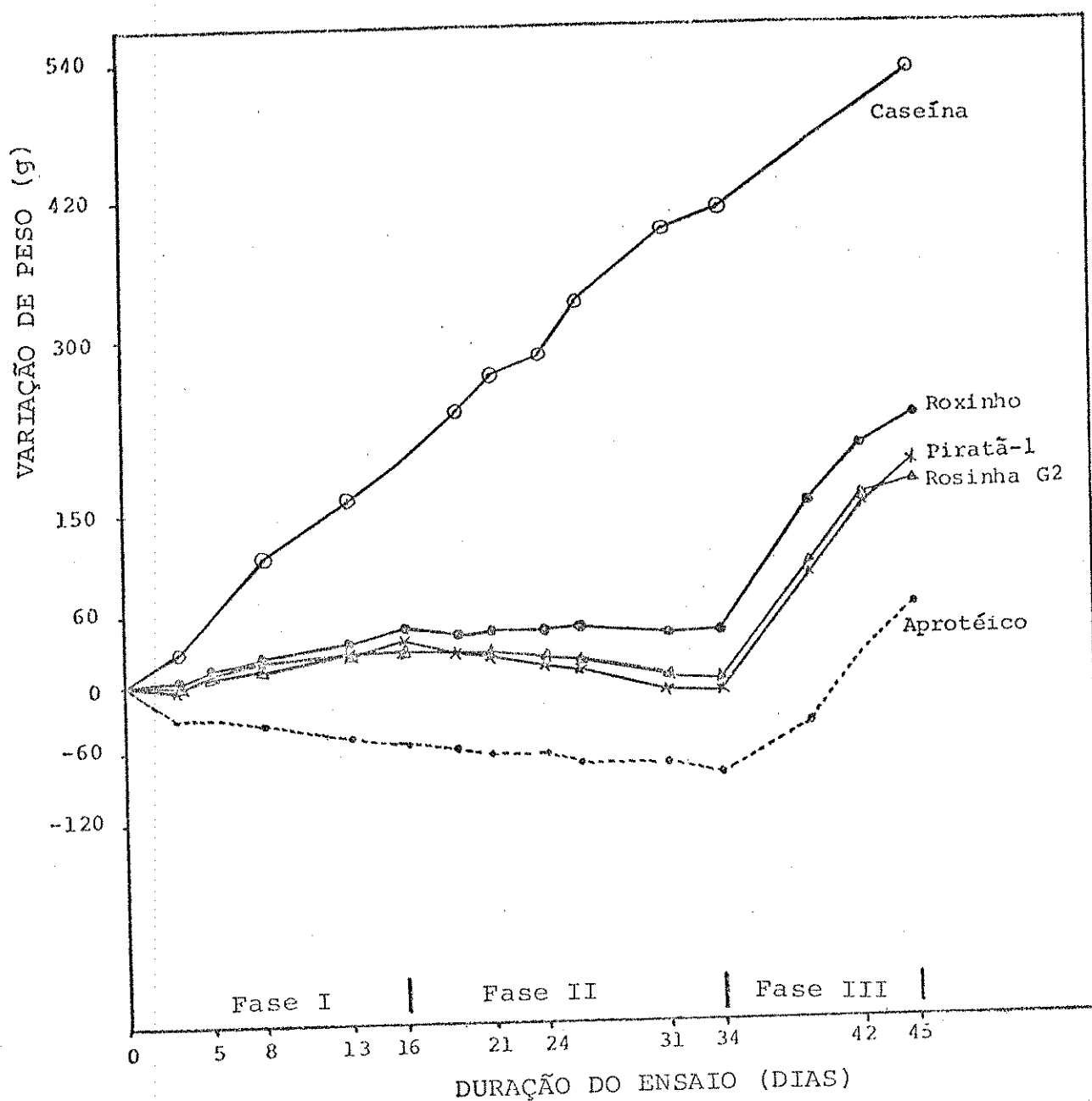


FIGURA 4 - Curvas de crescimento de ratos albinos, Wistar, alimentados com ração, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por misturas, em base protéica, de caseína e farinha integral de feijão cru (Fase I = 7,5% caseína + 2,5% feijão; Fase II = 5,0% caseína + 5,0% feijão; Fase III = 10% caseína). Os grupos controles foram: o que recebeu ração de caseína (10%) durante todo o ensaio e o que recebeu ração aprotéica nas Fase I e II e de caseína (10%) na Fase III.

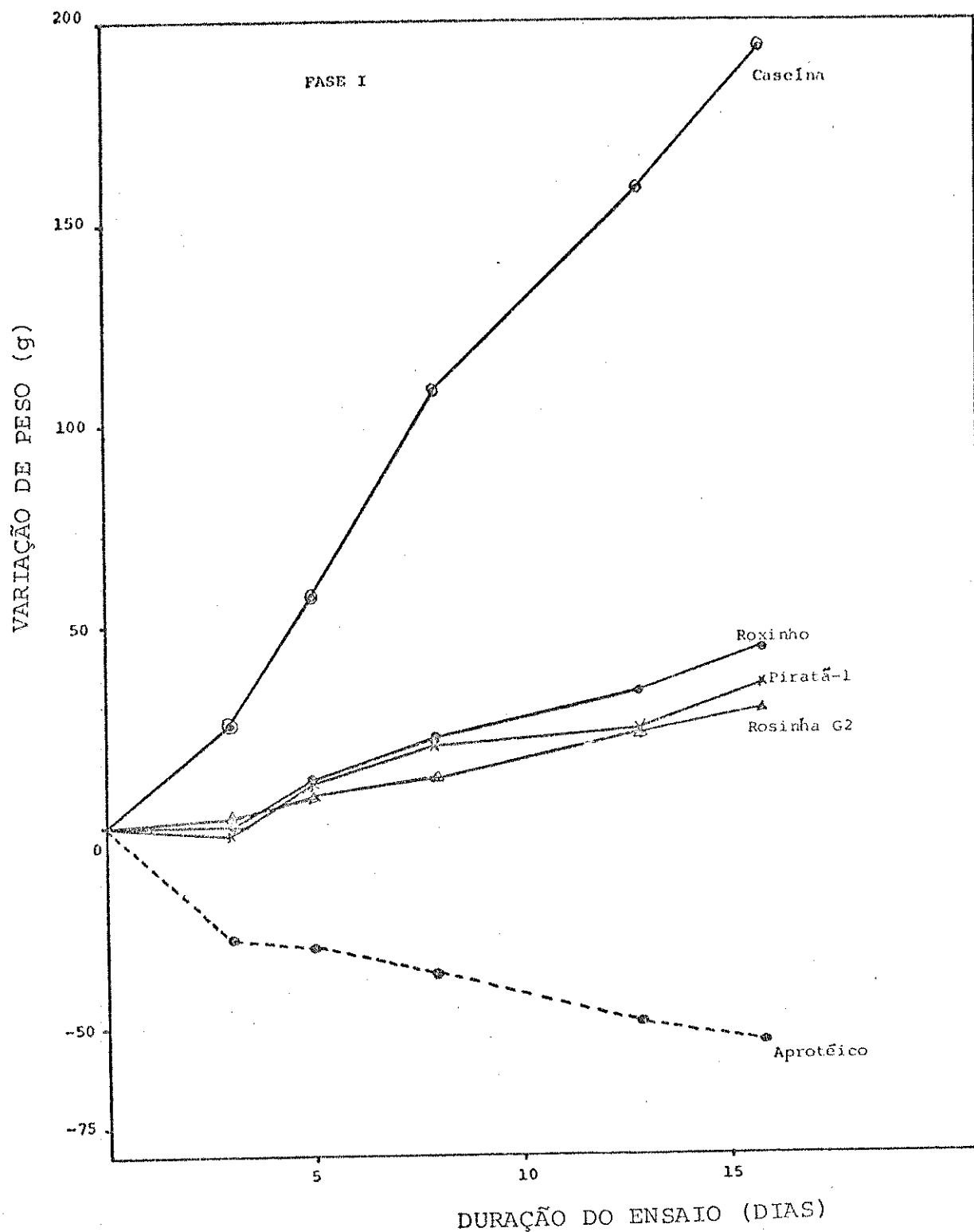


FIGURA 5 - (Fase I) Curvas de crescimento de ratos albinos, Wistar, em dietas com 10% de proteína proveniente de caseína (7,5%) e de farinha integral de feijão cru (2,5%). Os grupos que receberam ração de caseína (10%) e aprotéica foram considerados controles.

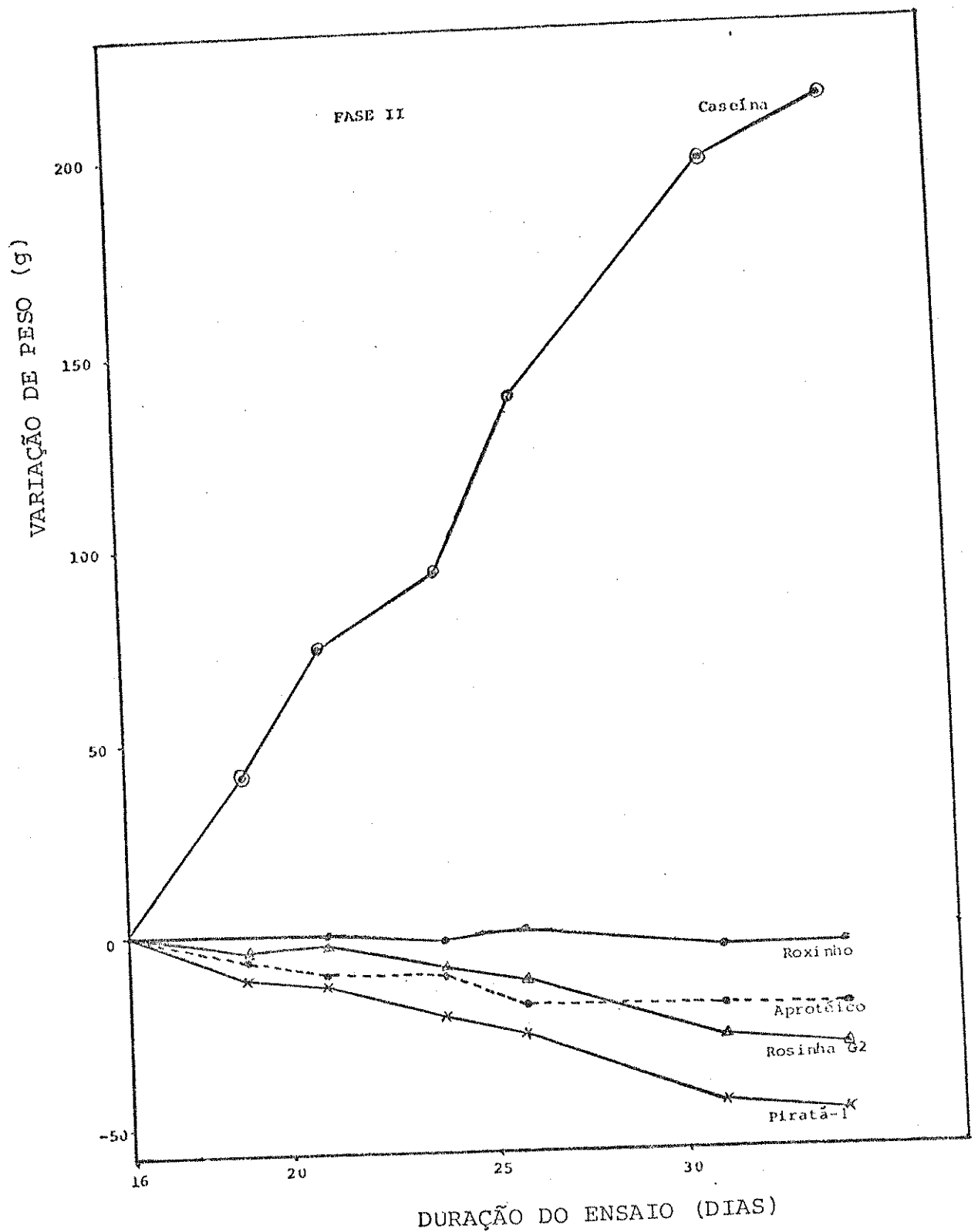


FIGURA 6 - (Fase II) Curvas de crescimento de ratos Wistar em dietas com 10% de proteína proveniente de caseína (5,0%) e de farinha integral de feijão cru (5,0%). Os grupos que receberam ração de caseína (10%) e aprotéica foram considerados controles.

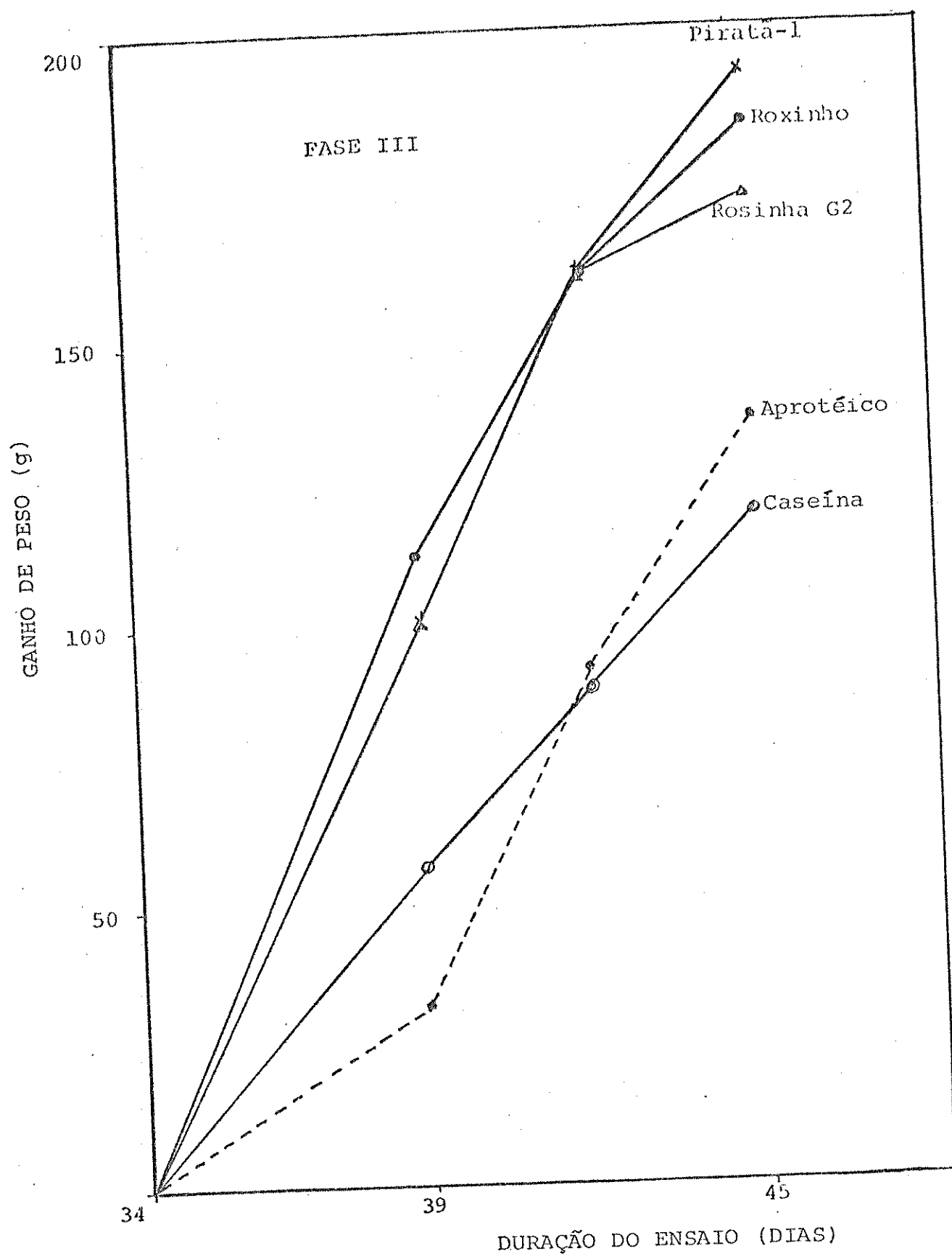


FIGURA 7 - (Fase III) Curvas de crescimento de ratos albinos Wistar, quando todos os grupos receberam rações, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por caseína.

feijão cru dos cultivares Piratã-1 e Rosinha G2 foi muito semelhante e que os alimentados com o cultivar Roxinho apresentaram maior desenvolvimento. Observa-se que o ganho de peso apresentado por estes grupos, foi muito inferior ao grupo alimentado com ração contendo somente caseína como fonte protéica e que o grupo alimentado com ração aprotéica perdeu peso durante toda esta fase.

Na Fase II (Figuras 4 e 6), os animais alimentados com ração contendo farinha de feijão cru do cultivar Piratã-1 perderam peso durante todo o período, com intensidade maior que os do grupo aprotéico, enquanto que o grupo em dieta de 'Roshinha G2' apresentou perda de peso com intensidade maior que o grupo aprotéico somente nos últimos cinco dias desta fase. O grupo da dieta contendo 'Roxinho' mostrou perdas de peso reduzidas, sempre inferiores às do grupo em dieta aprotéica.

Na Fase III (Figuras 4 e 7) quando todos os grupos foram alimentados com ração contendo caseína (10%) como única fonte protéica, observou-se que os animais que vinham sendo alimentados com ração contendo farinha de feijão cru, apesar de não mostrarem diferença entre tratamentos, foram os que apresentaram as maiores velocidades de crescimento, quando comparados aos grupos em dieta aprotéica e de caseína, nas duas primeiras fases do experimento. Estes resultados indicam que uma vez eliminada a causa da toxidez, ou seja, a presença de proteína de feijão cru na dieta, os animais retomaram um ritmo de crescimento bastante elevado, parecendo não haver efeito residual da ação antinutricional da proteína de feijão cru.

Analizando-se a digestibilidade aparente (Dap) das

QUADRO 6 - Resultados obtidos em ensaio biológico com ratos Wistar, quando alimentados com rações contendo 10% de proteína, fornecida por farinha de feijão cru ('Piratã-1', 'Rosinha G2' e 'Roxinho'), suplementada com caseína (Fase I = 7,5%; Fase II = 5,0%; Fase III = 10%) em comparação a um grupo alimentado com ração de caseína durante todo o experimento.

Fase Tratamento	Fase I (0 até 169 dia)		Fase II (199 até 349 dia)		Fase III (399 até 459 dia)	
	GP/PI	Dap. (%)	GP/PI	Dap. (%)	GP/PI	Dap. (%)
Piratã-1	0,23 a 0,96 (0,61)	68,9 a 70,3 (69,7)	-1,26 a -1,50 (-1,36)	48,8 a 51,5 (50,1)	4,04 a 5,21 (4,69)	85,7 a 87,2 (86,5)
Rosinha G2	0,27 a 0,74 (0,60)	68,2 a 70,0 (69,2)	-0,27 a -0,84 (-0,63)	48,3 a 55,9 (52,0)	3,46 a 4,62 (4,15)	89,4 a 89,7 (89,6)
Roxinho	0,00 a 1,03 (0,67)	69,2 a 71,2 (70,6)	-0,04 a -0,13 (-0,09)	52,9 a 56,5 (54,0)	3,56 a 4,83 (4,23)	85,6 a 86,7 (86,2)
Caseína	2,24 a 4,48 (3,25)	87,3 a 97,1 (93,0)	2,1 a 2,9 (2,40)	88,7 a 98,0 (94,1)	1,8 a 1,9 (1,87)	87,0 a 97,1 (92,1)

OBS: O peso inicial médio dos animais foi de 52,9g, para um peso total do grupo (4 animais) de 208,5 g.
Os resultados apresentados entre parênteses são as médias dos valores obtidos no período.
GP = ganho de peso (g); PI = proteína ingerida (g).

diferentes rações durante a Fase I do ensaio (Quadro 6), tem-se que o grupo que recebeu ração com 10% de caseína apresentou um valor médio de 93,0% e que, os que receberam rações contendo farinha de feijão cru (2,5% da proteína + 7,5% caseína) apresentaram digestibilidades mais baixas, ou sejam: Piratã-1 = 69,7%, Rosinha G2 = 69,2%; e Roxinho = 70,6%. Estes resultados decorrem da alta eliminação de proteína nas fezes pelos animais que receberam ração contendo farinha de feijão cru.

O efeito prejudicial da farinha de feijão cru também é evidenciado pela relação ganho de peso/proteína ingerida (GP/PI), pois os grupos mantidos em ração com 2,5% de proteína fornecida por esta farinha apresentaram as relações (Piratã-1 = 0,61; Rosinha G2 = 0,60; Roxinho = 0,67) sempre abaixo da apresentada pelo grupo alimentado com ração de caseína (3,25).

Durante a Fase II deste ensaio observou-se influência ainda mais drástica da presença da proteína de feijão cru do que a observada na Fase I, o que levou a uma menor ingestão e absorção de nitrogênio da ração, com consequente decréscimo na digestibilidade da proteína das rações contendo 5% de farinha de feijão cru (Piratã-1 = 50,1%; Rosinha G2 = 52,0%; Roxinho = 54,0%), enquanto que para a ração de caseína a digestibilidade foi de 94,1%.

A relação ganho de peso/proteína ingerida também evidencia o efeito tóxico e/ou antinutricional, da proteína de feijão cru, na medida em que a relação tornou-se negativa com o aumento de feijão na dieta. Esta relação, nesta fase, também evidencia um maior efeito tóxico do cultivar Piratã-1 (GP/PI = -1,36) quando comparado ao Rosinha G2 (GP/PI = -0,63) e ao Roxinho (GP/PI = -0,09), o que explica a tendência da curva de crescimento mostrada na Figura 6.

Quando todos os grupos passaram a receber ração de caseína (Fase III) não se observou, entre os tratamentos, diferenças expressivas entre os valores de digestibilidade (Piratã-1 = 86,5%; Rosinha G2 = 89,6%; Roxinho = 86,2%; caseína = 92,1%). Apesar destas diferenças, o aproveitamento da ração, pelos animais que receberam durante as Fases I e II ração adicionada de farinha integral de feijão cru, foi muito maior que o apresentado pelo grupo sempre tratado com ração de caseína, o que é mostrado pela relação ganho de peso/proteína ingerida, que foi de 4,69, 4,15 e 4,23 para os grupos Piratã-1, Rosinha G2 e Roxinho, respectivamente, e de 1,87 para o grupo mantido em caseína durante todo o experimento.

Visando uma avaliação mais completa das influências dos diversos níveis de adição das farinhas de feijão cru, dos cultivares em estudo, à caseína, usada como proteína padrão, foram também realizados estudos metabólicos (balanços de nitrogênio) durante as Fases I, II e III deste experimento e os resultados obtidos são mostrados no Quadro 7.

Observa-se que os animais que receberam ração, à qual foi adicionada farinha integral de feijão cru (Fases I e II), apresentaram menor ingestão de nitrogênio (N ing.) e maior eliminação de nitrogênio fecal (N fecal), cujas consequências são os menores valores de digestibilidade (Dig.) e de utilização líquida da proteína (NPU). Estes efeitos foram agravados pelo aumento da quantidade de feijão cru adicionado à ração (Fase II). Observa-se também, que o valor biológico das proteínas, na Fase I, foi afetado somente pela presença do cultivar Piratã-1, enquanto que na Fase II, o único cultivar sem efeito negativo para este índice foi o Roxinho. Deve-se notar que o cultivar Piratã-1 sempre apresentou-se mais tóxico que o Rosinha G2 e este mais

QUADRO 7 - Variações de peso e balanço de nitrogênio em ratos da linhagem Wistar quando alimentados com rações contendo 10% de proteína, fornecida por farinha de feijão cru ('Piratã-1', 'Rosinha G2' e 'Roxinho'), suplementada com caseína, em comparação a grupos alimentados com ração de caseína (10% proteína) e apteica.

Parâmetros Medidos ^{1,2}									
Tratamentos	N ing. (g)	N fecal (g)	N abs. (g)	N urinário (g)	Dig. (%)	NPU (%)	V.B. (%)	UAG ³ recup.	
Fase I (0 - 16 dias)	Caseína (10%) - Controle	2,13	0,27	1,86	0,42	89,8	72,3	79,1	-
	Caseína (7,5%) + Piratã-1 (2,5%)	1,19	0,38	0,81	0,26	72,7	54,4	74,8	5,04
	Caseína (7,5%) + Rosinha G 2 (2,5%)	1,19	0,35	0,84	0,23	75,4	60,0	79,6	4,09
	Caseína (7,5%) + Roxinho (2,5%)	1,31	0,36	0,95	0,22	76,5	63,3	82,7	4,02
	Aproteica	0,037	0,054	-0,017	0,045	-	-	-	-
Fase II (16 - 34 dias)	Caseína (10%) - Controle	2,44	0,30	2,14	0,73	90,1	62,6	71,8	-
	Caseína (5%) + Piratã-1 (5%)	1,10	0,53	0,57	0,33	56,8	29,3	51,5	12,24
	Caseína (5%) + Rosinha G 2 (5%)	1,06	0,49	0,57	0,30	59,1	33,1	56,0	8,23
	Caseína (5%) + Roxinho (5%)	1,38	0,56	0,82	0,23	63,4	43,9	69,6	14,81
	Aproteica	0,035	0,056	-0,021	0,023	-	-	-	-
Fase III (34 - 45 dias)	Caseína (10%) - Controle	3,08	0,32	2,76	0,77	89,8	64,8	72,2	-
	Caseína (10%) + Piratã-1 (0%)	2,56	0,24	2,32	0,49	90,8	71,8	79,1	-
	Caseína (10%) + Rosinha G 2 (0%)	2,29	0,22	2,07	0,55	90,5	66,6	73,6	-
	Caseína (10%) + Roxinho (0%)	2,60	0,26	2,34	0,54	89,8	68,9	76,8	-
	Aproteica + Caseína (10%)	1,59	0,23	1,36	0,59	84,3	47,9	56,1	-

¹ Os resultados representam a média de dois balanços, utilizando-se por balanço 04 ratos em cada tratamento.
² N ing. = Nitrogênio ingerido; N fecal = Nitrogênio fecal; N abs. = Nitrogênio absorvido; N urinário = Nitrogênio urinário; Dig. = Digestibilidade; NPU = Utilização líquida da proteína; V.B. = Valor biológico.
³ UAG recup. = % de unidades da atividade hemaglutinante recuperada nas fezes após o processo digestivo.

tóxico que o Roxinho.

Concluiu-se também que 2,5% de proteína de feijão (Fase I), particularmente do cultivar Piratã-1, já são suficientes para baixar significativamente a digestibilidade e o índice de utilização da proteína (NPU), da caseína; com 5% de proteína de feijão (Fase II) a digestibilidade da caseína caiu de 90,1% para 56,8% no caso do 'Piratã-1' (diminuição de 33,3%), para 59,1% em presença do cultivar Rosinha G2 (diminuição de 31,0%) e 63,4% em presença do cultivar Roxinho (diminuição de 26,7%). Em relação ao NPU os valores caíram de 62,6% para 29,3% (diminuição de 33,3%) para 33,1 (diminuição de 29,5%) e para 43,9% (diminuição de 18,7% em presença dos cultivares Piratã-1, Rosinha G2 e Roxinho, respectivamente.

O valor biológico da caseína (V.B.) é o que menos se alterou com a introdução na dieta, de feijão cru, porque este índice não leva em consideração a digestibilidade da proteína, que é, talvez, o fator limitante mais importante na utilização biológica da proteína de feijão.

Quando todos os grupos receberam ração cujo conteúdo do protéico foi totalmente fornecido por caseína (Fase III), as diferenças na ingestão de nitrogênio decorreram dos tamanhos dos animais, não se observando diferenças significativas quanto ao aproveitamento biológico da proteína das rações (digestibilidade, utilização líquida da proteína e valor biológico) entre os grupos que vinham recebendo ração de caseína ou adicionada de farinha integral de feijão cru, o que indicou não haver ação residual destas farinhas sobre os animais, o que não aconteceu com o controle em dieta aprotéica. Esses animais não se recuperaram totalmente pela adição de proteína à dieta na Fase III do experimento.

A ausência de efeito tóxico residual, associada à pequena variação no nitrogênio eliminado na urina, com o aumento de feijão cru na ração, sugere que a toxidez do feijão é exercida principalmente ao nível dos tecidos intestinais, particularmente da mucosa.

Por ocasião dos ensaios metabólicos determinou-se a atividade hemaglutinante das rações e das fezes, o que possibilitou calcular a recuperação da atividade hemaglutinante nas fezes dos ratos mantidos nas dietas que continham feijão. Os valores do Quadro 7 mostram que a recuperação da atividade nas fezes foi muito baixa. Isto indica que as lectinas, ao passarem pelo trato intestinal, são "modificadas" ou complexadas ao bolo alimentar ou aos tecidos, perdendo quase toda sua atividade. Como era esperado, as rações sem feijão cru não apresentaram qualquer atividade hemaglutinante, assim como as fezes dos animais alimentados com as mesmas.

O efeito negativo da presença do feijão cru sobre a digestibilidade da proteína (Quadro 7), talvez, o principal fator limitante à utilização biológica da proteína desta leguminosa e a constatação de que a toxidez se dá, principalmente, ao nível intestinal, motivou a determinação do conteúdo de ácidos nucleicos eliminados nas fezes (Quadro 8 e Figura 8) durante os diversos balanços metabólicos realizados neste ensaio, como forma de se ter uma indicação bastante segura da eliminação celular pelo trato intestinal dos ratos.

Observa-se que a presença do feijão cru aumenta o teor de ácidos nucleicos fecais, que este aumento está diretamente relacionado ao conteúdo de feijão cru na ração ingerida, que os cultivares Piratã-1 e Rosinha G2 sempre provocaram uma maior eliminação que o Roxinho e que, uma vez suprimida a presença do

QUADRO 8 - Quantidade de fezes produzidas e conteúdo de ácidos nucléicos nas fezes de ratos Wistar, alimentados com rações, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por misturas, em base protéica, de caseína e farinha integral de feijão cru (Fase I = 7,5% caseína + 2,5% feijão; Fase II = 5% caseína + 5% de feijão; Fase III = 10% caseína). Os grupos controles receberam: ração de caseína (10%) durante todo o ensaio; ração aprotéica nas Fases I e II e de caseína (10%) na Fase III.

Período de Balanço (dias)	Caseína		Piratã-1		Rosinha G2		Roxinho		Aprotéico	
	Fezes	AN ²	Fezes	AN ²	Fezes	AN ²	Fezes	AN ²	Fezes	AN ²
Fase I										
3 - 8	2,33	0,65	2,72	0,82	2,76	0,85	2,92	0,83	0,93	0,59
13 - 16	1,78	0,65	3,04	0,93	3,15	0,86	2,77	0,84	1,02	0,69
Fase II										
21 - 24	1,40	0,69	3,56	1,63	3,81	1,54	3,69	1,39	0,94	0,79
31 - 34	1,17	0,68	3,98	1,53	3,50	1,63	3,35	1,44	1,51	0,82
Fase III										
42 - 45	1,04	0,77	1,56	0,87	1,35	0,75	1,43	0,72	2,21	0,79

OBS: O peso inicial médio dos animais foi de 52,1 g para um peso total do grupo (4 animais) de 208,4 g.

¹ Fezes = quantidade de fezes (g) produzida por 100 g de peso vivo, no período.

² AN = conteúdo de ácidos nucléicos nas fezes (mg P/g fezes).

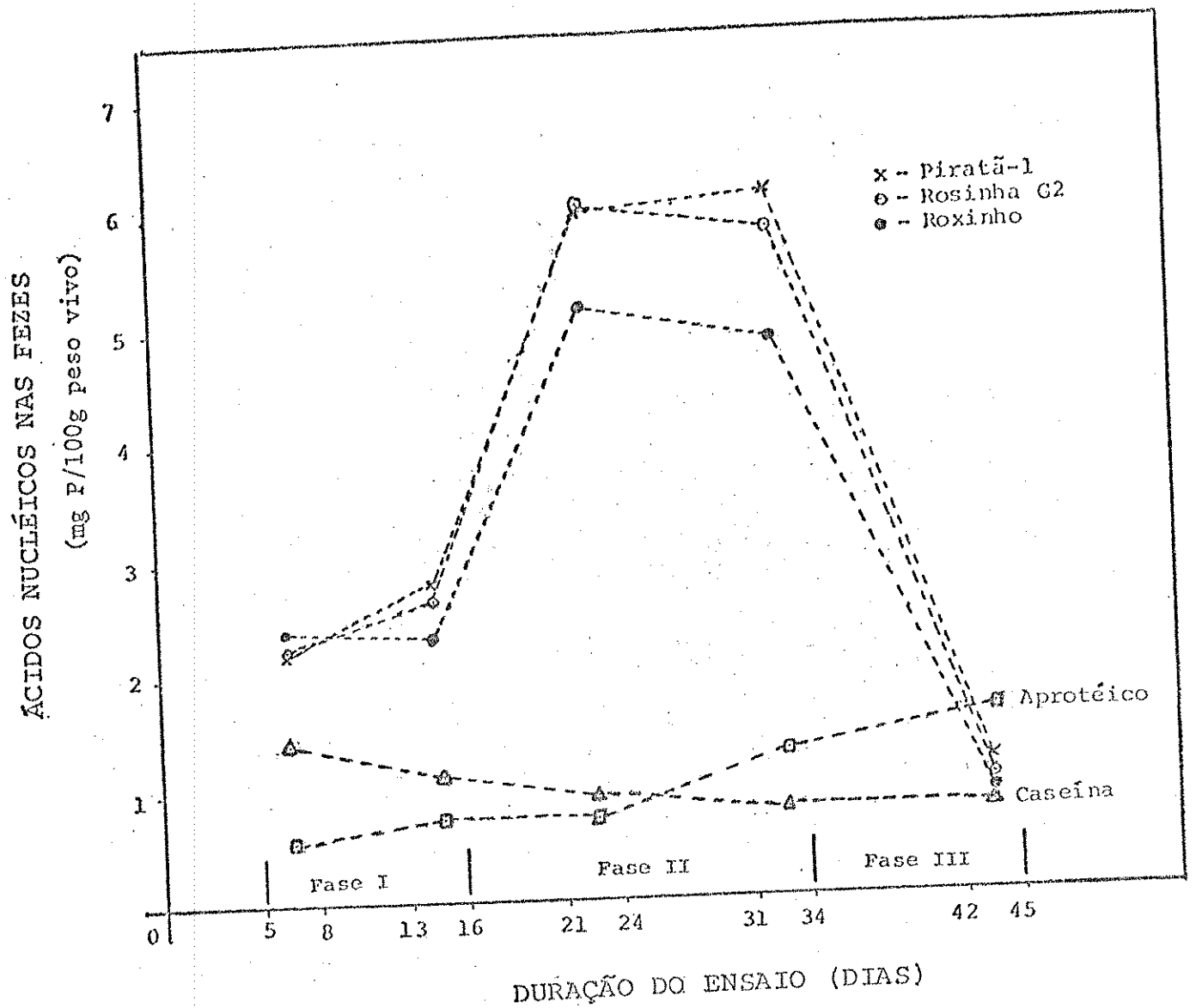


FIGURA 8 - Variação no conteúdo de ácidos nucleicos nas fezes de ratos Wistar, alimentados com rações, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por misturas, em base protéica, de caseína e farinha integral de feijão cru (Fase I = 7,5% caseína + 2,5% feijão; Fase II = 5,0% caseína + 5,0% feijão; Fase III = 10% caseína). Os grupos controles receberam: ração de caseína (10%) durante todo o ensaio; ração aprotéica nas Fases I e II e de caseína (10%) na Fase III. Os pontos de cada curva apresenta o valor médio do balanço de 3 dias.

feijão cru (Fase III), a eliminação fecal de ácidos nucléicos pelos animais caiu aos níveis dos alimentados com ração de caseína ao longo de todo o experimento.

A eliminação celular nas fezes, causada pela presença de feijão cru na ração, resulta da ausência de continuidade na parede das vilosidades intestinais devido a rompimentos bastante drásticos das mesmas, conforme mostram as Fotos 1 a 7 (Fig. 9 a 12). As fotos apresentam cortes histológicos do intestino delgado (duodeno) de ratos alimentados com rações contendo 10% de proteína, fornecida por caseína (Fotos 1 e 2 da Figura 9), por caseína (5%) + farinha integral de feijão cru (5%), dos cultivares Roxinho (Fotos 3 e 4 da Figura 10) e Piratã-1 (Fotos 5 e 6 da Figura 11) e com ração aprotéica (Figura 12). Estas fotografias mostram também que os efeitos prejudiciais tendem a se agravar com o tempo de alimentação.

Os resultados apresentados parecem deixar claro que o feijão cru é tóxico, quando adicionado à ração para ratos e que nesta toxidez a atividade hemaglutinante tem efeito destacado, ao contrário da atividade antitriptica e do conteúdo de taninos. Parece que as lectinas presentes têm a capacidade de combinar-se com estruturas das paredes celulares do trato intestinal, provocando eliminação celular, evidenciado pelo elevado conteúdo de ácidos nucléicos nas fezes, o que pode ser bastante grave, pois pode levar o animal à morte e contribuir para a baixa digestibilidade e o baixo índice de utilização da proteína (NPU) e, possivelmente, de outros nutrientes essenciais.

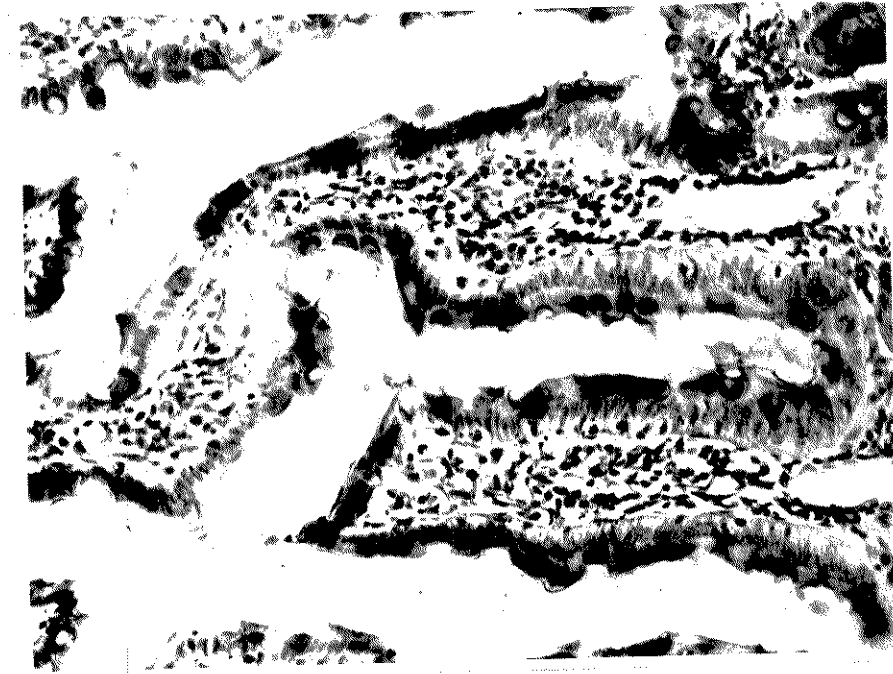


FOTO 1

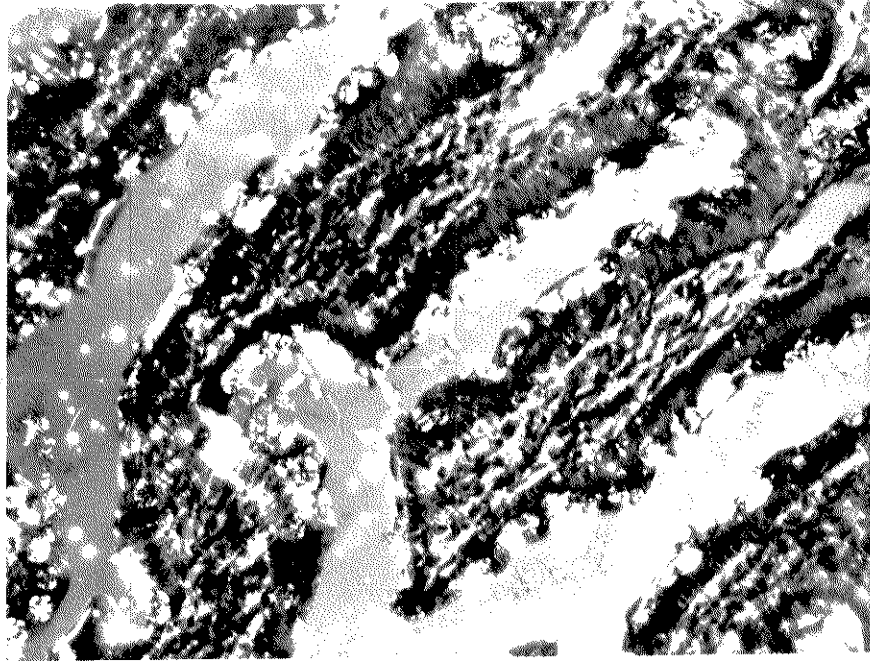


FOTO 2

FIGURA 9 - Cortes histológicos do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal), alimentados por 10 dias com ração de caseína (10% de proteína). Aumento = 64 x. Foto 1 - $\lambda = 545 \text{ nm}$; Foto 2 = Foto 1 com imagem birrefringente.



FOTO 3

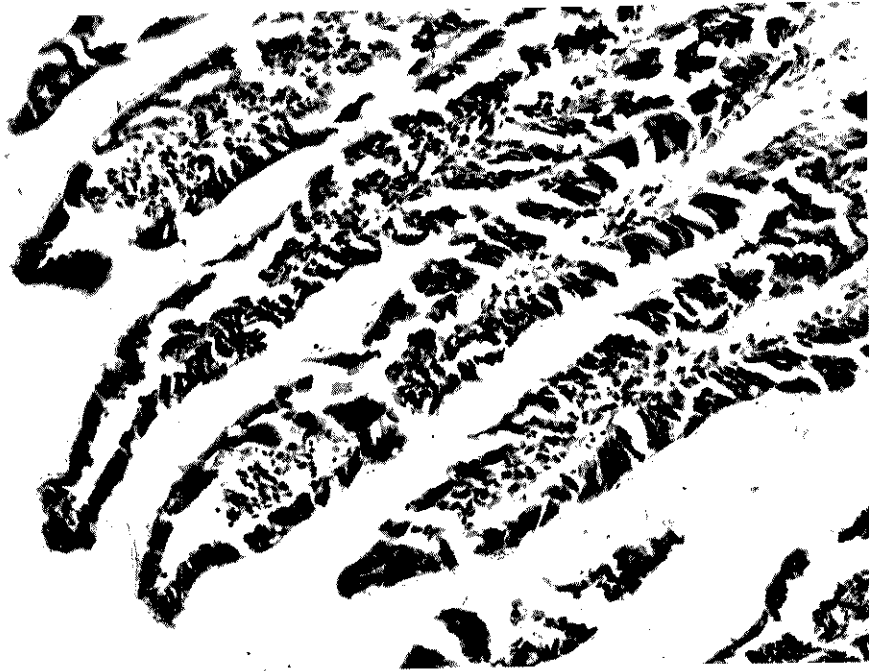


FOTO 4

FIGURA 10 - Cortes histológicos do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (seção longitudinal), alimentados com ração contendo 10% de proteína, fornecida por farinha integral de grãos de feijão cru do cultivar Roxinho (5%) e caseína (5%).

Aumento = 64 x. Foto 3 = animais alimentados por 3 dias. Foto 4 = animais alimentados por 10 dias.



FOTO 5

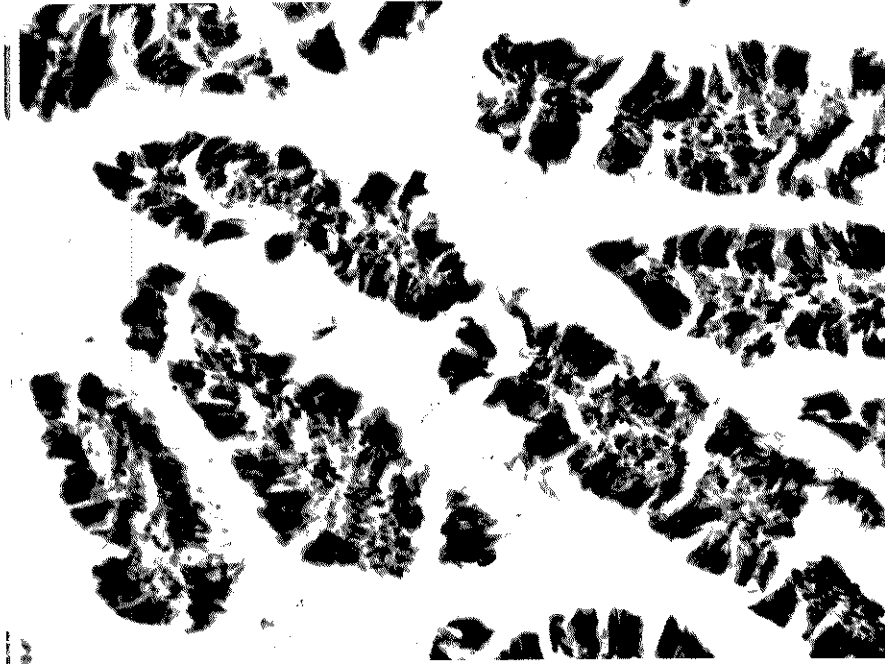


FOTO 6

FIGURA 11 - Cortes histológicos do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal) alimentados com ração contendo 10% de proteína, fornecida por farinha integral de grãos de feijão crus, do cultivar Piratã-1 (5%) e caseína (5%). Aumento = 64 x. Foto 5 - animais alimentados por 3 dias. Foto 6 - animais alimentados por 10 dias.

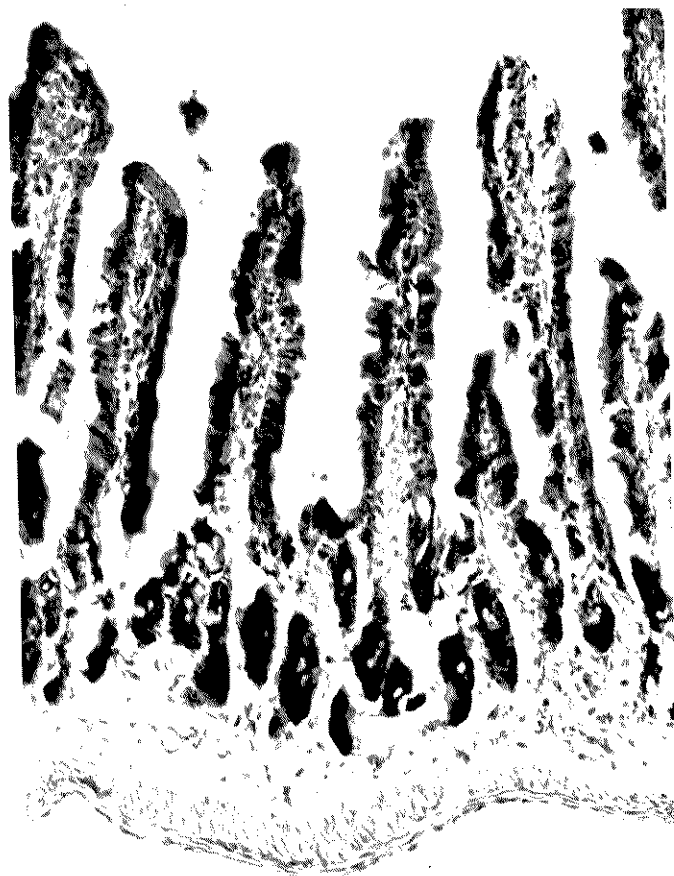


FOTO 7

FIGURA 12 - Corte histológico do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal), alimentados por 10 dias com ração aprotéica.
Aumento = 64 x.

6.4. Valor Protéico Relativo dos Cultivares

6.4.1. Fracionamento protéico e conteúdo de aminoácidos

O conteúdo das frações protéicas, albuminas e globulinas, a relação globulinas/albuminas, bem como a percentagem de nitrogênio não protéico (NNP) são apresentados no Quadro 9.

BAJAJ (1972) encontrou para ervilhas correlação positiva ($r = 0,949^{**}$) entre o Quociente de Eficiência Protéica (PER) e o conteúdo de albuminas, sendo estas a fração protéica mais importante nos grãos desta leguminosa.

Em feijões a fração mais importante é a formada pelas globulinas, não apenas pela maior quantidade (Quadro 9) como pela maior digestibilidade e valor nutritivo (ANTUNES, 1979; SGARBIERI, 1979; ANTUNES e SGARBIERI, 1980).

Nos cultivares aqui estudados a relação globulina/albumina variou entre 2,10 ('Iguaçu') e 4,46 ('Cara Suja') não tendo sido encontrada nenhuma correlação entre a relação globulina/albumina e o NPR.

No Quadro 9 pode-se ainda observar que o conteúdo de nitrogênio não protéico (NNP) variou de 0,47% ('Carioca') a 0,75% ('Piratã-1'), enquanto que o de albuminas esteve entre 2,20% ('Jalo') a 4,50% ('Aeté-1') e o de globulinas variou de 8,14% ('Iguaçu') a 13,76% ('Aroana'), representando as albuminas 9,20 a 20,09% (média 15,39) e as globulinas 33,36 a 52,93% (média 44%) do nitrogênio total dos grãos. O NNP representou de 13,61 a 19,18% do nitrogênio (média 15,10%) sendo que o restante permanece no resíduo insolúvel.

Neste quadro, observa-se também, que a relação

QUADRO 9 - Resultados obtidos com o fracionamento protéico da farinha integral dos grãos de feijão dos cultivares estudados.

Feijão	NNP (%)	Albuminas (% N x 6,25)	Globulinas (% N x 6,25)	Glob/Alb
Aroana	0,57 (13,70)	3,50 (13,45)	13,76 (52,93)	3,93
Cara Suja	0,56 (13,93)	2,86 (11,41)	12,77 (50,88)	4,46
Jalo	0,52 (13,61)	2,20 (9,20)	9,42 (39,45)	4,28
G. Precoce	0,63 (16,58)	3,20 (13,50)	11,27 (47,50)	3,52
Carioca	0,47 (14,28)	3,57 (17,39)	9,10 (44,34)	2,55
Piratã-1	0,75 (19,18)	4,02 (16,47)	9,68 (39,64)	2,41
Iguaçu	0,56 (14,36)	3,88 (15,92)	8,14 (33,36)	2,10
Rico-23	0,50 (14,24)	2,63 (11,97)	8,53 (38,81)	3,24
Aetê-1	0,56 (15,01)	4,50 (19,30)	9,91 (42,20)	2,20
Aetê-3	0,57 (16,01)	4,47 (20,09)	9,56 (42,99)	2,14
Rosinha G2	0,53 (16,11)	3,79 (18,47)	10,17 (49,56)	2,68
Roxinho	0,53 (14,25)	4,09 (17,58)	10,76 (46,23)	2,63

NNP = nitrogênio não protéico.

OBS: Os resultados entre parênteses indicam quanto cada uma dessas frações representa percentualmente no conteúdo protéico total do grão.

entre os conteúdos de globulinas e de albuminas variou de 2,10 ('Iguaçu') a 4,46 ('Cara Suja').

Os conteúdos em aminoácidos da farinha integral dos grãos de feijão dos cultivares estudados, foram determinados utilizando-se cromatografia de troca iônica (TI) (Quadro 10) e cromatografia gasosa (CG) (Quadro 11). Comparando-se os resultados apresentados nestes quadros tem-se que os conteúdos de lisina (7,12 - 8,81 g/100 g aminoácidos), de prolina (7,56 - 8,41 g/100 g aminoácidos), de 1/2 cistina (0,47 - 2,15 g/100 g aminoá

cidos) e de leucina (8,28 - 9,39 g/100 g aminoácidos), quando determinados por cromatografia gasosa, foram sempre mais elevados que os determinados por cromatografia de troca iônica (lisina = 6,27 - 6,99; prolina = 3,26 - 4,20; 1/2 cistina = tr - 0,98; leucina = 7,28 - 8,18 g/100 g aminoácidos). Os conteúdos de serina (5,83 - 6,97 g/100 g aminoácidos) e de ácido glutâmico (15,59 - 19,51 g/100 g aminoácidos) foram geralmente maiores, quando determinados por cromatografia gasosa que os determinados por cromatografia de troca iônica (serina = 5,91 - 7,21; ácido glutâmico = 16,99 - 18,64 g/100 g aminoácidos). Histidina não foi detectada pela cromatografia gasosa. Os conteúdos de ácido aspártico (9,29 - 13,28 g/100 g aminoácidos), de valina (4,03 - 5,09 g/100 aminoácidos), de metionina (tr - 0,67 g/100g aminoácidos) e de isoleucina (2,76 - 3,22 g/100 g aminoácidos) e de treonina (3,82 - 4,67 g/100 aminoácidos), quando determinados por cromatografia gasosa foram sempre menores que os determinados por cromatografia de troca iônica (ácido aspártico = 13,14 - 15,43, valina = 4,63 - 5,49, metionina = 0,91 - 1,11, isoleucina = 3,75 - 4,78, treonina = 4,99 - 5,72 g/100 g aminoácidos). Os conteúdos de arginina (3,30 - 7,89 g/100 g aminoácidos) e de fenilalanina (5,23 - 6,05 g/100 g aminoácidos), foram geralmente menores quando determinados por cromatografia gasosa, que quando determinados por cromatografia de troca iônica (arginina = 6,02 - 7,29; fenilalanina = 5,18 - 5,70 g/100 g aminoácidos). Os conteúdos de glicina (3,74 - 5,53 g/100 g aminoácidos), de alanina (3,96 - 6,08 g/100 g aminoácidos) e de tirosina (3,27 - 3,77 g/100 g aminoácidos), determinados por cromatografia gasosa foram equivalentes aos determinados por cromatografia de troca iônica (glicina = 4,25 - 4,77; alanina = 3,95 - 4,29; tirosina = 2,92 - 3,28 g/100 g aminoácidos). 0

QUADRO 10 - Conteúdo de aminoácidos (g/100 gaa) da farinha integral de grãos de feijão dos culti-
vares estudados, cuja determinação foi feita por cromatografia de troca iônica.

Feijão Aminoácido	CARA		JALO	QUILANO	CARIOCA	PIRATÃ-1	IGUAÇU	RICO 23		AETÉ 1		AETÉ 3		ROSINHA		ROXINHO
	AROANA	SUJA		PRECOGE									G2			
Lisina	6,33	6,49	6,43	6,77	6,27	6,96	6,49	6,68	6,97	6,80		6,45	6,99	6,45		6,99
Histidina	3,21	2,86	3,12	2,85	2,24	2,94	2,88	2,84	3,04	3,25		2,56	2,80	2,56		2,80
Arginina	6,03	6,80	6,61	6,17	6,61	7,29	6,33	6,02	6,27	6,42		6,32	6,36	6,32		6,36
Ac. Aspártico	14,75	13,79	14,10	13,35	15,43	13,14	13,33	13,30	14,09	14,63		13,54	13,53	13,54		13,53
Treonina	5,17	5,29	4,99	5,25	5,72	5,14	5,68	5,07	5,46	5,29		5,46	5,32	5,46		5,32
Serina	6,50	6,55	5,92	7,21	6,34	5,91	6,47	6,20	5,96	6,03		6,37	6,42	6,37		6,42
Ac. Glutâmico	17,69	17,66	18,42	18,64	17,22	17,69	18,03	18,03	16,99	17,87		17,66	18,08	17,66		18,08
Prolina	3,60	4,20	3,54	3,26	3,44	4,02	3,98	4,07	3,79	3,90		3,69	3,72	3,69		3,72
Glicina	4,36	4,77	4,29	4,28	4,60	4,32	4,25	4,38	4,55	4,70		4,71	4,24	4,71		4,24
Alanina	4,13	4,22	3,99	3,95	4,09	4,08	4,07	4,29	3,99	4,09		4,22	4,14	4,22		4,14
1/2 Cistina	0,38	0,22	0,33	tr.	0,93	0,71	0,74	0,89	0,74	0,98		0,69	0,36	0,69		0,36
Valina	4,90	4,63	5,47	5,20	5,19	5,25	4,74	4,85	5,14	4,82		5,49	5,05	5,49		5,05
Metionina	1,04	1,03	1,06	1,00	1,05	1,11	0,98	1,09	1,05	0,91		1,09	1,03	1,09		1,03
Isoleucina	3,75	3,93	4,35	4,78	3,95	3,90	4,03	4,36	4,69	3,95		3,87	4,40	3,87		4,40
Leucina	8,18	7,85	7,50	7,84	7,37	7,54	7,67	8,01	7,64	7,28		7,80	7,77	7,80		7,77
Tirosina	3,27	3,12	3,21	3,15	3,13	2,92	3,27	3,28	3,27	2,93		3,21	3,25	3,21		3,25
Fenilalanina	5,67	5,54	5,70	5,57	5,46	5,35	5,62	5,57	5,40	5,18		5,51	5,40	5,51		5,40
Triptofânio	1,04	1,03	0,95	1,01	0,93	1,69	1,14	1,13	0,95	0,94		1,37	1,03	1,37		1,03
Recuperação (g/16 g N)	114,7	105,1	107,6	106,7	107,0	105,0	105,5	106,6	108,8	104,5		104,8	107,3	104,8		107,3

O25: O conteúdo de triptofânio foi determinado pelo método de SPIES (1967).

QUADRO 11 - Conteúdo de aminoácidos (g/100 g aa) da farinha integral de grãos de feijão dos cultivares estudados, cuja determinação foi feita por cromatografia gasosa.

Feijão	AROANA	CARA SUJA	JALO	GOIANO PRECOCE	CARIOCA	PIRATÁ-1	IGUAÇÚ	RICO 23	AETE-1	AETE-3	RUSINHA G2	ROXINHO
Aminoácido												
Lisina	8,05	8,24	7,36	8,04	7,31	8,27	6,84	7,52	7,83	7,48	7,12	8,81
Histidina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Arginina	6,39	7,56	6,36	4,51	5,93	3,30	7,98	3,98	4,62	6,33	5,23	4,57
Ac. Aspártico	9,36	9,29	13,28	12,96	12,13	12,35	13,07	12,50	12,25	11,48	11,51	11,63
Treonina	4,44	4,49	4,02	4,07	4,55	4,63	4,46	4,64	4,54	3,98	4,67	3,82
Serina	6,75	6,60	6,25	6,48	6,48	6,07	6,43	6,97	6,58	6,12	6,77	5,83
Ac. Glutâmico	18,23	17,53	17,74	17,34	17,37	19,51	16,79	15,59	17,59	18,44	17,64	19,41
Prolina	7,96	8,04	7,50	7,89	8,27	7,94	7,77	7,85	7,83	7,56	8,41	8,06
Glicina	4,53	4,69	4,46	5,01	4,69	3,74	3,81	5,53	4,77	4,56	4,67	4,45
Alanina	5,08	5,07	4,91	5,43	5,51	3,96	4,34	6,08	5,33	5,22	5,49	5,31
1/2 Cistina	1,59	0,47	1,58	1,69	1,93	1,76	1,89	1,99	1,84	2,15	1,84	1,62
Valina	4,63	4,69	4,46	4,70	4,69	5,07	4,14	5,09	4,54	4,32	4,67	4,03
Metionina	0,19	0,39	0,67	0,21	0,28	0,44	0,51	tr	0,34	tr	0,24	0,53
Isoleucina	3,05	3,16	2,90	2,92	2,89	3,19	3,01	3,10	3,07	3,22	2,92	2,76
Leucina	8,89	9,39	8,36	8,78	8,41	8,48	8,40	8,85	8,74	8,73	8,75	8,28
Tirosina	3,60	3,54	3,34	3,34	3,31	3,53	3,73	3,53	3,40	3,77	3,27	3,71
Fenilalanina	5,83	5,74	5,35	5,54	5,23	5,95	5,60	5,64	5,67	5,63	5,37	6,05
Triptofânio	1,09	1,08	1,02	1,08	1,00	1,79	1,21	1,11	1,04	0,98	1,44	1,11
Recuperação	106,7	103,4	88,7	94,8	91,9	89,2	95,4	89,5	87,2	122,4	89,5	93,3
(g/16 g N)												

OBS: O conteúdo de triptofânio foi determinado pelo método de SPIES (1967).

teor de triptofânio também é equivalente em ambos os quadros, pois os dados apresentados nos Quadros 10 e 11 foram obtidos pelo mesmo método colorimétrico (SPIES, 1967).

Os Quadros 10 e 11 também mostram que a cromatografia de troca iônica sempre possibilitou análises com níveis de recuperação bastante homogêneos e com variação relativamente baixa (104,5 g/16 g N para o 'Aetê-3' a 114,7 g/16 g N para o ('Aroana'), o que não ocorreu com a cromatografia gasosa (87,2 g/16 g N para o 'Aetê-1' a 122,4 g/16 g N para o 'Aetê-3').

Quando se fez o correlacionamento direto entre os resultados obtidos por cromatografia gasosa (Quadro 11) e os obtidos por cromatografia de troca iônica (Quadro 10), obtiveram-se os coeficientes do Quadro 12, onde é mostrado que a correlação foi sempre maior que 0,903 para todos os cultivares analisados. Isto indica que, apesar das diferenças comentadas, no geral, os dois métodos apresentam desempenhos equivalentes.

Correlacionando-se os teores de enxofre total (Quadro 2) com os teores de aminoácidos sulfurados apresentados nos Quadros 10 e 11, obteve-se correlação positiva e significativa ao nível de 10%, quando as determinações foram feitas por cromatografia de troca iônica ($r = 0,527$) e não significativa quando estas foram feitas por cromatografia gasosa ($r = 0,027^{ns}$), uma vez que este último método mostrou-se menos sensível à presença da metionina que o de troca iônica, apesar da proteção dada ao meio hidrolítico pela adição do 2-mercaptoetanol.

6.4.2. Quantificação e biodisponibilidade da metionina

O Quadro 13 apresenta o conteúdo de metionina po

QUADRO 12 - Coeficientes de correlação entre as análises de aminoácidos feitas por cromatografia gasosa e de troca iônica.

Variedade	Coeficiente de Correlação
Aroana	0,903
Cara Suja	0,927
Jalo	0,958
Goiano Precoce	0,931
Carioca	0,927
Piratã-1	0,938
Iguaçu	0,955
Rico-23	0,937
Aeté-1	0,942
Aeté-3	0,948
Rosinha G2	0,933
Roxinho	0,931

tencialmente disponível, determinado por cromatografia gasosa, tendo-se o BrCN como reagente e observa-se que os valores mais elevados foram os apresentados pelos cultivares Goiano Precoce (1,99 g/100 g proteína) e Iguaçu (1,96 g/100 g proteína) e os mais baixos pelos cultivares Cara Suja (0,96 g/100 g proteína) e Aeté-1 (1,28 g/100 g proteína), os quais estão ao nível dos valores encontrados por APOSTOLATOS & HOLF (1981), que trabalharam com cultivares americanos de feijão..

No Quadro 13 também são mostrados os teores de metionina determinados por cromatografia de troca iônica (anali

QUADRO 13 - Conteúdo e biodisponibilidade da metionina, dos grãos dos cultivares estudados.

Cultivar	Metionina (g/100 g prot.)			Biodisponibilidade (%)	
	BrCN ¹	Troca Iônica ²	Ensaio Biológico ³	BrCN ⁴	Troca Iônica ⁵
Aroana	1,60	1,15	0,54	33,7	46,9
Cara Suja	0,96	1,08	0,23	23,9	21,3
Jalo	1,30	1,14	0,48	36,9	42,1
G. Precoce	1,99	1,07	0,57	28,6	53,3
Carioca	1,30	1,12	0,35	26,9	31,3
Piratã-1	1,51	1,16	0,56	37,1	48,3
Iguaçu	1,96	1,03	0,77	39,3	74,7
Rico-23	1,67	1,16	0,43	25,7	37,1
Aetê-1	1,28	1,14	0,44	34,4	38,6
Aetê-3	1,74	0,95	0,70	40,2	73,7
Rosinha G2	1,54	1,14	0,59	38,3	51,7
Roxinho	1,35	1,10	0,49	36,3	44,5

¹ Metionina potencialmente disponível determinada por cromatografia gasosa, tendo-se o BrCN como reagente.

² Metionina determinada por cromatografia de troca iônica (analisador de aminoácidos).

³ Metionina biologicamente disponível na farinha integral dos feijões autoclavados (121°C, 10 min.).

⁴ Biodisponibilidade da metionina calculada em relação à determinada pela reação com BrCN.

⁵ Biodisponibilidade da metionina calculada em relação à determinada por cromatografia de troca iônica.

sador de aminoácidos) e tem-se que os maiores valores estiveram entre 1,14 - 1,16 g/100 g proteína ('Jalo', 'Aetê-1'; 'Rosinha G2', 'Aroana', 'Piratã-1', 'Rico-23') e os menores entre 0,95 - 1,03 g/100 g proteína ('Aetê-3', 'Iguaçu'), os quais foram sempre menores que os determinados por cromatografia gasosa, com exceção do 'Cara Suja', assim como os valores encontrados para a disponibilidade biológica da metionina da farinha integral dos grãos autoclavados (121°C, 10 min.) e dentre os cultivares estudados, o que apresentou o menor valor foi o Cara Suja (0,23 g/100 g proteína), enquanto que o maior foi apresentado pelo Iguaçu (0,77 g/100 g proteína).

Calculando-se em porcentagem, quanto que o conteúdo de metionina biologicamente disponível representa do determinado por cromatografia gasosa, tendo-se o BrCN como reagente, observa-se que esta biodisponibilidade variou de 23,9% ('Cara Suja') a 40,2% ('Aetê-3') com valor médio de 33,4% e desvio padrão de 5,68. Fazendo-se o mesmo tipo de relação entre os teores de metionina biologicamente disponível e os determinados por cromatografia de troca iônica, tem-se a biodisponibilidade variando de 21,3% ('Cara Suja') a 73,7 ('Aetê-3')-74,7% ('Iguaçu') com valor médio de 43,6% e desvio padrão de 19,8. A biodisponibilidade calculada em relação ao teor de metionina determinado por troca iônica apresentou-se sempre maior, com exceção do 'Cara Suja', que a calculada em relação ao teor determinado por cromatografia gasosa, consequência dos valores obtidos pelos dois métodos de análise. É interessante observar, que apesar das diferenças entre as biodisponibilidades calculadas, o correlacionamento entre elas é significativo ($r = 0,755^{**}$).

Não se detectou correlação significativa entre os conteúdos de metionina ou sua biodisponibilidade (Quadro 13)

com qualquer dos índices nutricionais apresentados no Quadro 14, o que pode ser atribuído ao fato de que há um conjunto de fatores (digestibilidade, disponibilidade biológica dos aminoácidos sulfurados, conteúdo de taninos, etc), que determinam o valor nutricional do grão de feijão tratado termicamente.

Os teores de metionina biologicamente disponíveis apesar de inferiores aos determinados por cromatografia gasosa, tendo-se BrCN como reagente, (Quadro 13) apresentaram correlação positiva e significativamente ($r = 0,820^{**}$), obedecendo a equação: $Y = 0,672 + 1,687X$, onde Y é o teor de metionina potencialmente disponível da amostra, determinado por cromatografia gasosa e X é o conteúdo de metionina biologicamente disponível, determinado em ensaios de crescimento com ratos Wistar (Figura 13).

6.4.3. Avaliação biológica da proteína

Os resultados obtidos com a alimentação de ratos Wistar, com ração contendo 10% de proteína, fornecida por farinha integral dos grãos de feijão autoclavado (121°C , 10 minutos) são apresentados no Quadro 14. O NPR ("net protein ratio") variou de 2,15 ('Cara Suja') a 2,54 ('Aroana') com valor médio de 2,33 (desvio padrão = 0,125), enquanto que a relação ganho de peso/consumo de proteína esteve entre 0,79 ('Goiano Preçoce') e 1,16 ('Aroana') com valor médio de 0,97 (desvio padrão = 0,115). A digestibilidade aparente da proteína variou de 61,3% ('Aetê-1') a 72,6% ('Cara Suja'), com valor médio de 65,2% e desvio padrão de 3,72.

Observa-se que a autoclavagem dos grãos eliminou a toxicidade dos mesmos, possibilitando o crescimento dos ani

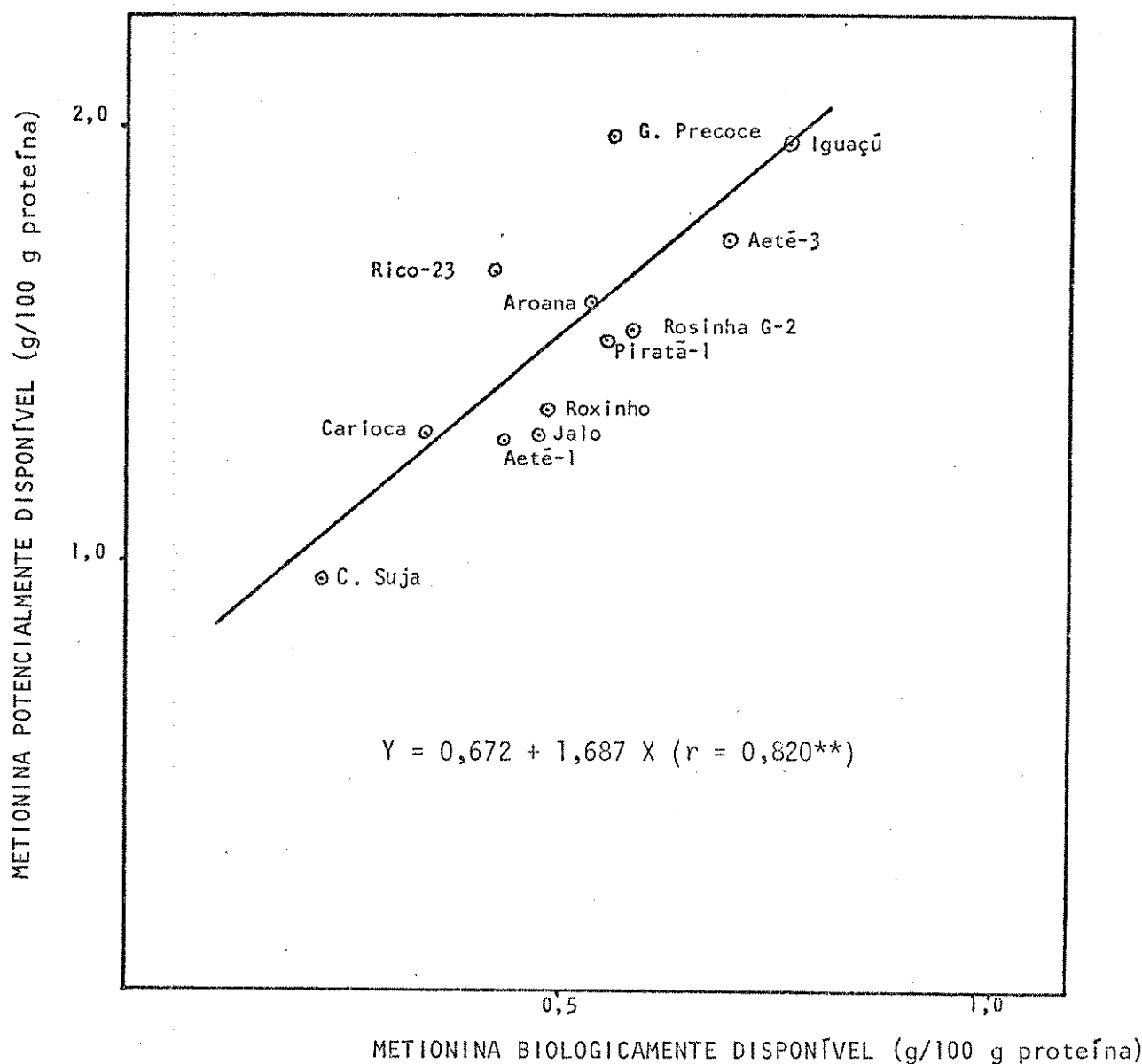


FIGURA 13 - Metionina biologicamente disponível na farinha dos feijões autoclavados (121°C, 10 min), dos cultivares estudados, em relação ao conteúdo deste aminoácido, determinado por cromatografia gasosa, tendo-se o BrCN como reagente (metionina potencialmente disponível).

QUADRO 14 - Resultados obtidos em ensaios biológicos com ratos Wistar, alimentados com ração contendo 10% de proteína fornecida por farinha integral dos grãos de feijão, dos cultivares estudados, autoclavados (121°C, 10 min).

Feijão	NPR ¹	Ganho Peso (g)	Consumo Proteína (g)	Ganho Peso/ Consumo Proteína	Dig.2 aparente (%)	AIN ³
Aroana	2,54	48,0	41,3	1,16	64,1	26,47
Cara Suja	2,15	37,5	38,8	0,97	72,6	28,17
Jalo	2,19	32,5	40,0	0,81	64,4	25,77
G. Precoce	2,36	25,2	33,4	0,79	65,2	21,78
Carioca	2,53	33,0	31,7	1,04	64,0	20,19
Piratã-1	2,27	37,4	38,4	0,97	71,7	27,55
Iguaçu	2,24	28,8	34,6	0,83	65,0	22,47
Rico-23	2,35	42,5	40,2	1,05	65,8	26,45
Aeté-1	2,40	46,5	42,8	1,09	61,3	26,27
Aeté-3	2,42	37,5	38,7	0,97	59,3	22,91
Rosinha G2	2,31	39,0	41,9	0,93	64,0	26,80
Roxinho	2,23	44,9	43,4	1,03	64,9	28,21

¹ NPR (Net Protein Ratio) = (Ganho de Peso + Perda de Peso Gr. Aprotéico) / Proteína Consumida.

² Dig. Aparente = $\left[\frac{(N \text{ ingerido} - N \text{ fecal})}{N \text{ ingerido}} \right] \times 100$.

³ AIN (Absorção Intestinal de Nitrogênio) = N ingerido - N fecal.

mais, sem causar-lhes os danos relatados nos experimentos anteriores.

Dos parâmetros estudados neste experimento (Quadro 14), observa-se que os conteúdos de enxofre total, mostrados no Quadro 2, correlacionam-se significativa e positivamente com os valores de NPR ($r = 0,599^*$), com o ganho de peso ($r = 0,604^*$) e com a relação ganho de peso/consumo de proteína ($r = 0,718^{**}$) (Figura 14). Como o enxofre é parte integrante das moléculas dos aminoácidos sulfurados e sendo estes limitantes na proteína de feijão, era de se esperar que um conteúdo maior de enxofre pudesse resultar em maior índice de aproveitamento protéico.

A relação ganho de peso/consumo de proteína correlacionou-se negativamente, ao nível de 10% de probabilidade ($r = -0,511$), com o conteúdo de taninos dos grãos (Quadro 3). Esta ação negativa dos taninos poderá ser devida a interações dos mesmos com as proteínas, diminuindo a proteólise, ou com a parede intestinal dos animais, impedindo que a absorção dos nutrientes se processe em nível adequado e portanto influenciando no seu aproveitamento.

Durante este ensaio também foram feitos cortes histológicos do duodeno dos ratos alimentados com as rações cujo conteúdo protéico foi fornecido por farinha de grãos autoclavados, dos cultivares Piratã-1 e Roxinho, avaliados como sendo o mais e o menos tóxico, respectivamente, quando crus. As Fotos 8 e 9 (Figura 15) e a Foto 10 (Figura 16) mostram que as vilosidades intestinais não apresentaram as descontinuidades comentadas na apresentação das Fotos 3 e 4 (Figura 10) e Fotos 5 e 6 (Figura 11), ou seja, que o tratamento térmico dos grãos

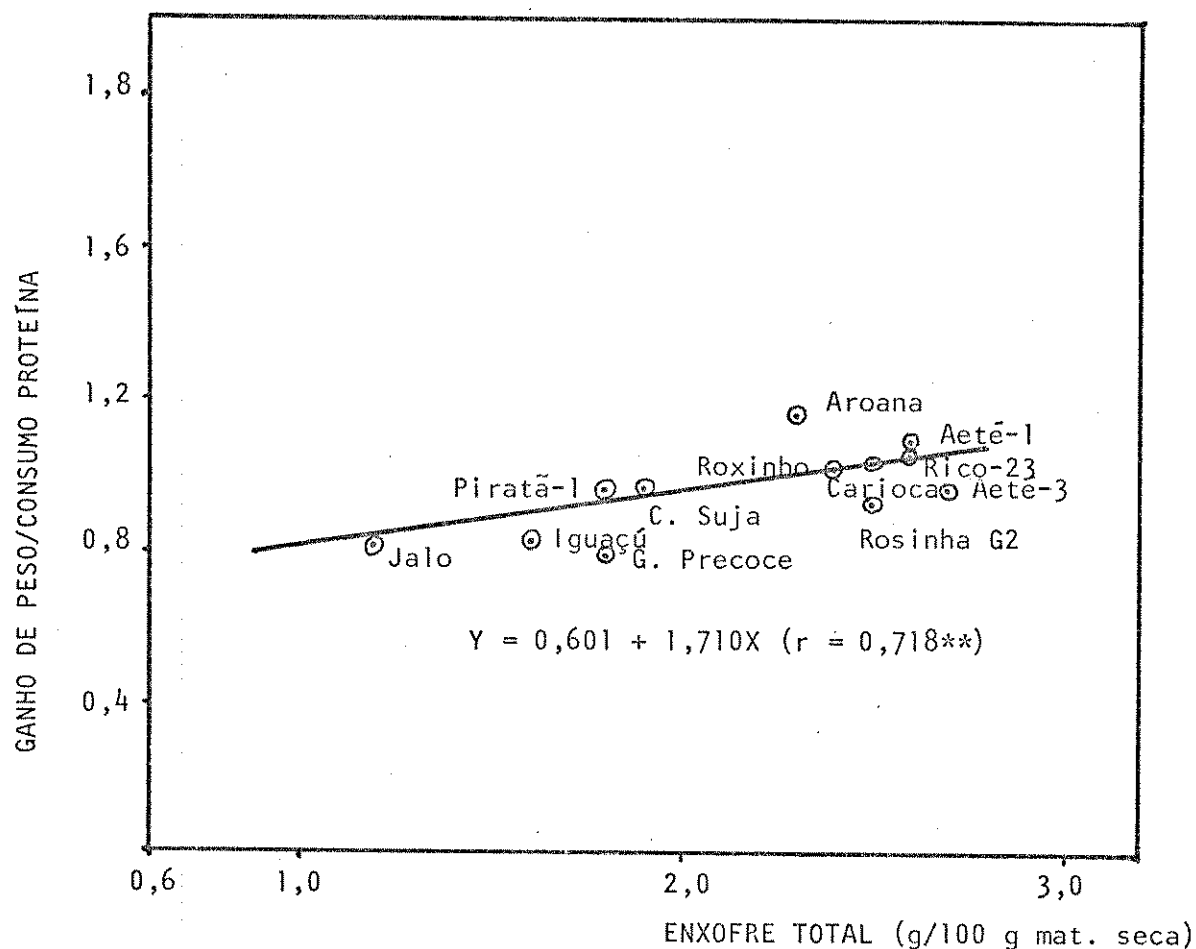


FIGURA 14 - Conteúdo de enxofre total, dos grãos dos cultivares estudados, em relação ao quociente ganho de peso/consumo de proteína, obtido em ensaio biológico com ratos Wistar, alimentados com ração contendo 10% de proteína fornecida por farinha integral dos grãos de feijão, autoclavados (121°C, 10 min.).

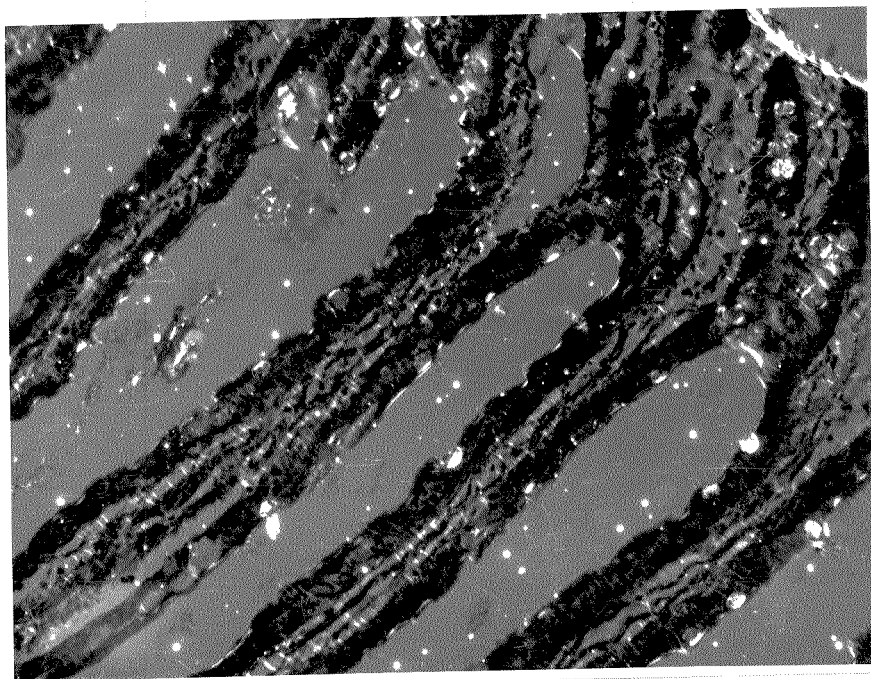


FOTO 9



FOTO 8

GURA 15 - Cortes histológicos do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal), alimentados por 10 dias com ração, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por farinha integral de feijão autoclavado, do cultivar Roxinho. Aumento = 64 x. Foto 9 = imagem birrefringente.

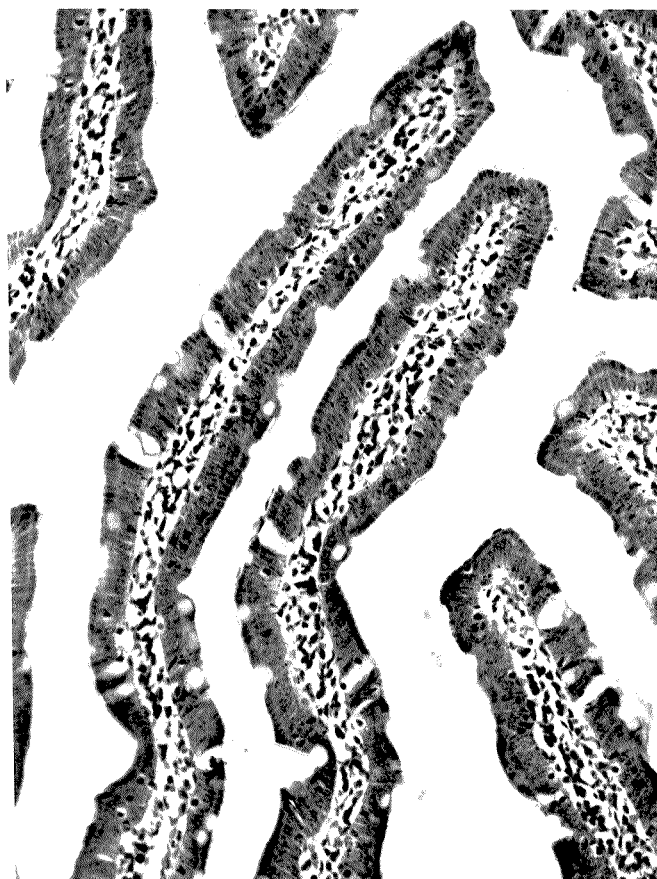


FOTO 10

FIGURA 16 - Corte histológico do intestino delgado (duodeno) de ratos Wistar (secção longitudinal), alimentados por 10 dias com ração, cujo conteúdo protéico (10%) foi suprido por farinha integral de feijão autoclavado, do cultivar Piratã-1. Aumento = 64 x.

foi efetivo na eliminação da causa deste efeito maléfico. No entanto, estas fotos, principalmente a Foto 9 (Figura 15), pela sua birrefringência, quando comparadas às Fotos 1 e 2 (ração de caseína) (Figura 9) mostram um grande esgotamento do conteúdo das células caliciformes, cuja secreção é constituída principalmente de glicoproteínas. Este esgotamento deve contribuir para a baixa digestibilidade da proteína dos grãos de feijão (Quadro 14) mesmo após tratamento térmico, uma vez que grande parte desse material glicoprotéico deverá ser eliminado com as fezes e portanto, influir decisivamente na digestibilidade aparente, determinada pelo método clássico. Essas alterações da mucosa e nas secreções gastro-intestinais sugerem que a baixa digestibilidade das proteínas do feijão poderá ser devida, mais a um aumento nas perdas de nitrogênio endógeno do que propriamente a uma resistência dessas proteínas à proteólise.

As comprovações experimentais de que, efetivamente, as dietas de feijão causam uma maior perda de nitrogênio endógeno, bem como a identificação e a natureza dos agentes causais, dependem de futuras investigações.

7. DISCUSSÃO

7.1. Composição e Toxicidade Relativa dos Cultivares

Os grãos de todos os cultivares estudados apresentaram composições centesimais (Quadro 2) dentro de limites já estabelecidos para outros cultivares desta espécie (ZUCAS *et alii*, 1971; TOBIN & CARPENTER, 1978). O conteúdo de taninos e as atividades antitriptica e hemaglutinante (Quadro 3) também apresentaram variabilidade concordante com os valores já relatados por diversos autores (JAFFÉ, 1950a; DE MUELENAERE, 1965; KAKADE & EVANS, 1965a; LIENER, 1976; ANTUNES, 1979; ANTUNES & SGARBIERI, 1980).

A toxicidade dos grãos de feijão, dos cultivares estudados, foi bastante efetiva, provocando a morte dos animais no período médio de 3,8 dias ('Goiano Precoce') a 8,4 dias ('Aroana'), quando os mesmos receberam ração, cujo conteúdo proteico (10%) foi totalmente suprido por farinha integral dos grãos crus (Quadro 4). Este efeito letal a ratos, em período relativamente curto, foi também observado por BRESSANI *et alii* (1963), KAKADE & EVANS (1965a), ANTUNES (1979) e ANTUNES & SGARBIERI (1980).

A letalidade relatada, relaciona-se diretamente com o índice de toxidez da proteína (perda de peso/proteína ingerida) e ambos mostram estreita correlação com a atividade he

maglutinante do grão. Não se detectou qualquer correlacionamento entre os parâmetros indicativos de toxicidade e o conteúdo de tanino e/ou a atividade antitriptica dos grãos.

A relação entre a fração protéica hemaglutinante e a toxidez dos grãos de feijões crus já foi detectada por vários autores, como JAFFÉ (1962), EVANS *et alii* (1973), PUSZTAI *et alii* (1975), MANCINI FILHO & LAJOLO (1981), apesar de DE MUELENAERE (1965) e STEAD *et alii* (1966) não a terem encontrado. O fato destes últimos autores, não terem detectado correlação entre a atividade hemaglutinante e a toxidez, deve ter sido em virtude de diferenças nos materiais estudados, pois DE MUELENAERE (1965) não fez diferenciação entre *Phaseolus vulgaris* e *Canavalia ensiformis* e STEAD *et alii* (1976), entre *Ph. vulgaris* e *Glycine max*. HONAVAR *et alii* (1962) já haviam mostrado correlação negativa entre a atividade de lectinas isoladas de diferentes cultivares de *Ph. vulgaris* e o desenvolvimento de ratos em ração com 10% de caseína. Observaram inibição do crescimento dos ratos ao nível de 0,5% de lectina e morte dos animais quando este nível atingiu 1,5% para os feijões 'Red Kidney' e 4,6% para os 'Black Kidney'. As observações destes autores foram co-substanciadas por EVANS *et alii* (1973) que isolaram um fator tóxico inibidor do crescimento de ratos, de *Ph. vulgaris* e concluíram ser esta fração protéica similar, se não idêntica, às lectinas. PUSZTAI & PALMER (1977) também verificaram a existência desta correlação, quando mostraram o efeito prejudicial que a adição de lectina à dieta, causava ao NPU (Índice de Utilização Líquida da Proteína) em ratos alimentados com ração de caseína (5% de proteína), enquanto que a adição de proteína de feijão, isenta de lectina, não mostrava qualquer efeito tóxico. FIGUEROA *et alii* (1981) observaram ainda que a toxidez dependia

não só do nível de lectinas na dieta, mas também do nível de proteína na ração, quando medida pelo coeficiente de eficácia alimentar.

A ausência de correlacionamento da toxicidade com a fração antitriptica poderia ser explicada pela capacidade que os animais têm de compensar a presença destes inibidores com maior produção de proteases intestinais, conforme demonstrado pelos trabalhos desenvolvidos por KHAYAMBASHI & LYMAN (1969), GREEN & LYMAN (1969), LYMAN *et alii* (1974), SCHEEMAN & LYMAN (1975) e LIENER (1979) e pela ausência de toxidez deste fator, quando adicionado à ração com 10% de proteína (SGARBIERI, 1979).

Os taninos por sua vez, também não mostraram correlacionamento com os vários níveis de toxicidade dos cultivares estudados, o que deve ser atribuído às concentrações relativamente baixas detectadas, ou ainda, porque as proteínas do feijão não possuem grande afinidade para com os taninos, ou seja, não são prolaminas, não possuem estrutura aberta, não são ricas em prolina e nem possuem alto conteúdo de carboidratos, além de adaptação dos animais através de suas glândulas parótidas, conforme o demonstrado pelos trabalhos de BUTLER e colaboradores (HAGERMAN & BUTLER, 1980; MEHANSHO *et alii*, 1983; BUTLER *et alii*, 1984).

Quando os ratos foram alimentados com ração cujo conteúdo protéico era fornecido por caseína (5%) e farinha integral de feijão cru (5%) (Quadro 5), voltou-se a observar, durante todo o experimento, estreito correlacionamento entre a toxicidade da ração, expresso pela perda de peso dos animais, e o índice de toxidez da proteína e entre este índice e a ingestão protéica. Novamente, o componente do grão que correlacionou-se, ao longo de todo o experimento, com o índice de toxidez foi a

atividade hemaglutinante, enquanto que a antitriptica e o conteúdo de taninos continuaram a não mostrar correlação com a toxicidade. Este experimento também tornou possível evidenciar a baixa digestibilidade da proteína da farinha de feijão cru, pois a mistura de caseína com feijão cru apresentou digestibilidade entre 51% e 65%, enquanto que a da caseína foi de aproximadamente 90%. Efeito semelhante a este, foi observado por JAFFÉ *et alii* (1955), JAFFÉ & CAMEJO (1961), HONAVAR *et alii* (1962), JAFFÉ (1962) e SGARBIERI (1979), quando adicionaram hemaglutininas isoladas de feijão, a rações de caseína, para ratos.

Este experimento mostrou também, que os animais apresentaram uma adaptação ao longo do tempo, expressa pela diminuição no índice de toxidez da proteína, que refletiu-se na recuperação do ganho de peso apresentado para alguns cultivares (Figura 3), apesar da ingestão de ração ter permanecido praticamente constante. Este efeito deve estar associado à propriedade antinutricional das lectinas, ou seja à habilidade das mesmas em se ligarem a receptores específicos das células epiteliais da parede intestinal (JAFFÉ & CAMEJO, 1961; ETZLER & BRANSTATOR, 1974), provocando rompimento das microvilosidades (PUSZTAI *et alii*, 1979a, b), e à capacidade dos animais se recuperarem, frente às diferentes reações provocadas pelas lectinas.

Novo experimento com proporções variáveis de feijão e caseína veio confirmar as observações dos experimentos anteriores, quanto à perda de peso pelos animais, alimentados com farinha crua; quanto à relação ganho de peso/proteína ingerida desta ração; quanto à capacidade de recuperação dos animais; e quanto à digestibilidade da proteína (Figuras 4, 5, 6 e 7 e Quadro 6).

O ganho de peso dos animais é resultado da diges

tibilidade e do valor biológico da ração com a qual eles foram alimentados e neste experimento os parâmetros analisados (Quadros 6 e 7), tornam clara a ação do feijão cru sobre os animais, ou seja, a presença deste material no trato intestinal leva a um aumento significativo na quantidade de nitrogênio eliminado nas fezes, com consequente diminuição da digestibilidade e influência no valor biológico, ou melhor, quanto maior a atividade hemaglutinante da ração, maior será a eliminação fecal de nitrogênio, com lesões mais graves no trato intestinal e consequente menor aproveitamento protéico. Outro resultado revelador de que o principal efeito tóxico ocorre a nível intestinal é a pronta recuperação dos ratos quando da retirada do feijão da ração, recuperação inclusive mais eficiente que a dos que vinham sendo alimentados com ração aprotéica (Figura 7 e Quadro 7).

O efeito detectado pelos parâmetros discutidos é resumido pelo valor da utilização líquida da proteína (NPU) e vem comprovar mais uma vez as proposições de JAFFÉ (1960), JAFFÉ & CAMEJO (1961), ETZLER & BRANSTATOR (1974) e PUSZTAI *et alii* (1979a, b) quando mostraram que as lectinas possuem capacidade de reagir com as células epiteliais e vilosidades intestinais, provocando rompimento, com consequente eliminação do material celular com as fezes e prejudicando a absorção dos nutrientes e também facilitando a penetração, no organismo, de substâncias potencialmente perigosas que podem colaborar para levar o animal à morte (HEWITT *et alii*, 1973; JAYNE-WILLIAMS, 1973; JAYNE-WILLIAMS & BURGESS, 1974; HARA *et alii*, 1983; ROSSI *et alii*, 1984).

A reação das hemaglutininas com as células epiteliais e microvilosidades intestinais é demonstrada pela baixa

recuperação da atividade hemaglutinante, após a passagem da ração contendo farinha de feijão cru pelo trato intestinal do rato (Quadro 7). Que esta reação leva ao rompimento das estruturas intestinais é demonstrado pelo aumento observado no conteúdo de ácidos nucleicos nas fezes; o que não deve ser atribuído ao crescimento anormal de bactérias no trato intestinal, conforme o demonstrado por BENDER & MOHAMMADIHA (1981); e também mostrado pelas fotografias (Figuras 9 a 12) evidenciando a ausência de continuidade na superfície das vilosidades intestinais e rompimento bastante intenso das mesmas, agravado com a ingestão prolongada de feijão cru. ROSSI *et alii* (1984) trabalhando com lectinas isoladas, também observaram efeito patogênico das mesmas às microvilosidades e que há um aumento no número de citolisossomos das células absorptivas.

A falta de toxidez residual associada à pequena variação no nitrogênio urinário com o aumento de feijão cru na ração, ao elevado nível de inativação das hemaglutininas quando da passagem das mesmas pelo trato intestinal, e à elevada eliminação de ácidos nucleicos nas fezes, mostra que o efeito tóxico principal desta leguminosa passa-se ao nível da luz intestinal, embora PUSZTAI *et alii* (1979 a, b), tenham encontrado aumentos consideráveis na excreção de nitrogênio urinário quando os ratos foram alimentados com ração contendo feijão cru. No entanto, deve-se considerar que o exposto nas Figuras 9 a 12 (Fotos 1 a 7) indica que a destruição das vilosidades causam consequências bastante drásticas ao animal, além da perda de peso pela falta de absorção de nutrientes, as quais podem, sem dúvida, levar o animal à morte.

Do exposto, parece ficar claro que os grãos crus de todos os cultivares estudados são tóxicos e que esta toxidez

está intimamente ligada à atividade hemaglutinante dos mesmos, pois esta fração protéica lesiona drasticamente a estrutura intestinal dos animais, levando-os a um aproveitamento inadequado da ração, mostrado pela redução na digestibilidade, no valor biológico e na utilização líquida da proteína (NPU). Este efeito, se bastante intenso e prolongado, pode levar os animais à morte, apesar da relativa capacidade de adaptação observada.

7.2. Valor Protéico Relativo dos Cultivares

Verificando-se a extratibilidade da proteína dos cultivares estudados observa-se que os níveis estiveram entre 62,26% ('Jalo') e 84,14% ('Rosinha G2'), com destaque para a fração globulina que sempre apresentou-se em maior quantidade (39 a 50%) (Quadro 9). Estes dados concordam com os relatados por diversos autores (OSBORNE, 1894; SMITH *et alii*, 1959; SGARBIERI, 1979) que também extraíram proteína de feijão com solução de NaCl. A variabilidade existente quanto à relação globulinas/albuminas (Quadro 9) esteve dentro dos limites detectados por SGARBIERI (1979). Não se detectou qualquer correlacionamento significativo entre os parâmetros determinados para a avaliação do valor nutricional dos grãos autoclavados (Quadro 14) e o conteúdo das diferentes frações protéicas e suas relações, não sendo possível o estabelecimento de equações de regressão, como fez BAJAJ (1972), para ervilhas.

As proteínas dos cultivares estudados mostraram-se deficientes em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e com teores bastante elevados de lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina + tirosina e treonina, fato co-substanciado pela literatura revisada.

Os métodos utilizados para a determinação dos conteúdos de aminoácidos dos grãos, apesar de apresentaram-se com desempenhos equivalentes, conforme mostram os coeficientes de correlação apresentados no Quadro 12, sempre superiores a 0,903, são bastante diferentes na sua execução, na recuperação da amostra aplicada e nos resultados conseguidos para alguns dos aminoácidos. A determinação por cromatografia gasosa possui na sua execução um maior número de etapas do que por troca iônica, as quais tornam-na mais demorada e com maior possibilidade de erros fortuitos e/ou sistemáticos, implicando portanto em oscilações maiores na recuperação, conforme mostram os Quadros 10 e 11. A cromatografia gasosa além de não permitir a detecção da histidina, não possibilitou a obtenção de resultados satisfatórios para a metionina, o que não ocorreu com a troca iônica, apesar de ter possibilitado melhores resultados para a 1/2 cistina. Quanto aos outros aminoácidos essenciais para o homem, os resultados equivaleram-se e sempre estiveram dentro dos limites detectados e relatados pelos autores citados na literatura revisada.

Da comparação dos dois métodos empregados na determinação dos conteúdos de aminoácidos concluiu-se que o método de troca iônica (Analisador) foi mais satisfatório para o feijão.

Shandu (1969), que estudou grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L.) e Porter (1972) que analisou cinco linhagens de *Phaseolus vulgaris*, L., uma de *Vigna sinensis* e uma de *Phaseolus aureus*, citados por PORTER (1972), assim como EVANS & BOUTER (1974) que analisaram cultivares de *Vigna unguiculata*, sugeriram a existência de correlação entre os conteúdos de enxofre total e de aminoácidos sulfurados. A ausência de correlação sig

nificativa entre os conteúdos de enxofre e os teores de aminoácidos sulfurados determinados por cromatografia gasosa e o baixo nível de significância (10%) entre estes conteúdos e os teores determinados por troca iônica, poderá ser atribuída à falta de recuperação total desses aminoácidos pelos dois métodos de determinação.

A quantificação da metionina potencialmente disponível, por cromatografia gasosa, tendo-se o BrCN como reagente, foi feita procurando-se estabelecer um método que pudesse, rápida e facilmente, prever a disponibilidade biológica da metionina de grãos de feijão, em substituição aos métodos biológicos, demorados e imprecisos. Isto foi conseguido correlacionando-se os dados obtidos nesta análise cromatográfica com os de metionina biologicamente disponível ($r = 0,820^{**}$), expresso pela equação $Y = 0,672 + 1,687X$ (Figura 13), o que indica a potencialidade do método usado.

Os teores de metionina potencialmente disponível foram geralmente maiores que os determinados pelo analisador de aminoácidos o que pode ser atribuído à influência destruidora das oxidações durante a hidrólise ácida, que precede este último método e/ou à presença, no grão de feijão de substâncias sulfuradas que também podem reagir com o BrCN, para a formação de quantidade adicional do metiltiocianato, e que não são extraíveis pelo tratamento com etanol 70%. Estes resultados influenciaram decisivamente nos valores encontrados para a biodisponibilidade da metionina, cujo valor é bastante dependente do conteúdo total de metionina, utilizado para o cálculo da metionina biologicamente disponível.

As dificuldades existentes na avaliação da biodisponibilidade da metionina do feijão cru são em parte, con

sequência da inexistência de metodologia adequada e acessível para a determinação precisa, do conteúdo total deste aminoácido em grãos de feijão, seja pela possibilidade de oxidação do mesmo, seja pela presença de interferentes ainda não perfeitamente controláveis ou pela falta de sensibilidade dos métodos propostos.

Um aspecto evidenciado pelos dados do Quadro 13 é que boa parte dos resíduos de metionina, apesar de reagirem ativamente com o BrCN não são utilizáveis pelo rato ou que o crescimento de ratos Wistar em dietas de feijões, forneceria respostas inadequadas para a medida da disponibilidade biológica da metionina, talvez pela perda endógena deste aminoácido sulfurado, em níveis exagerados.

A biodisponibilidade da metionina, para os cultivos estudados, calculada em relação aos conteúdos de metionina determinados pelo analisador de aminoácidos (Quadro 13), apresentaram-se distribuídos em torno dos valores encontrados microbiologicamente, por EVANS *et alii* (1974) para o feijão "navy" cv. Sanilac (51%) e dos determinados através de ensaio metabólico com ratos, por EVANS & BAUER (1978) para o feijão "navy" (50%) e por ANTUNES (1979) para feijões do cv. Rosinha G2 (55,78%). Estes valores equivaleram-se aos encontrados por SGARBIERI (1979) e SGARBIERI *et alii* (1979) que trabalharam com cultivares brasileiros ('Carioca' = 29,3%, 'Rico-23' = 40,6%. 'Rosinha G2' = 46,0%). Da comparação das biodisponibilidades relacionadas pelos diversos autores com a calculada em relação aos conteúdos de metionina determinados pela reação com o BrCN e avaliação por cromatografia gasosa, observa-se que estes últimos valores apresentaram-se geralmente menores e nem sempre comparáveis com os da literatura.

Os resultados do Quadro 13 e Figura 13 permitem afirmar que a determinação do conteúdo de metionina de grãos de feijão por cromatografia gasosa, tendo o BrCN como reagente, representa importante potencial para avaliar rápida e mais facilmente o conteúdo de metionina biologicamente disponível, o que será de grande importância para programas de melhoramento desta leguminosa. Por esse motivo esta metodologia deverá ser estudada em maiores detalhes.

O efeito benéfico do aquecimento ao valor nutritivo das proteínas dos grãos de feijão foi mostrado pelo Quadro 14, uma vez que as mesmas quando cruas, mesmo que misturadas com caseína, causavam perda de peso aos animais, além de terem digestibilidade muito baixa, (Quadros 5, 6 e 7) para depois de aquecidas passarem a suportar o crescimento dos ratos (NPR = 2,33 e ganho de peso/consumo proteína = 0,97, em média), com aumento considerável na digestibilidade (65,19% em média). Este efeito melhorador, do tratamento térmico, ao valor nutricional das proteínas dos grãos de feijão, já está bastante descrito e discutido na literatura (BRESSANI *et alii*, 1963; KAKADE & EVANS, 1965a; EVANS & BANDEMER, 1967; JAFFÉ & VEGA LETTE, 1968; MORAES e SANTOS & DUTRA DE OLIVEIRA, 1972; SGARBIERI *et alii*, 1979; SGARBIERI, 1979; MARQUEZ & LAJOLO, 1981).

A correlação significativa ($r = 0,718^{**}$) encontrada entre o teor de enxofre total (Quadro 2) e o parâmetro ganhos de peso/unidade de proteína ingerida (Quadro 14) indica a importância do enxofre e evidentemente dos aminoácidos sulfurados, no valor protéico dos grãos de feijão. A possibilidade de uso do enxofre total como parâmetro indicador do valor nutricional das proteínas do grão, conforme o recomendado por PORTER (1972) e EVANS & BOULTER (1974), deverá ser objeto de estudos

mais aprofundados que venham esclarecer as dúvidas ainda existentes.

O correlacionamento inverso entre o conteúdo de taninos dos grãos de feijão e a relação ganho de peso/ consumo de proteína está dentro do sugerido na literatura (JAFFÉ & FLORES, 1975; ELIAS *et alii*, 1979; CARMONA & JAFFÉ, 1980; BRESSANI *et alii*, 1980) e a falta de correlação mais efetiva pode ser atribuída à baixa variabilidade no teor de taninos, mostrada pelos cultivares estudados, quando estes são comparados com os valores mostrados por CARMONA & JAFFÉ (1980) e BRESSANI *et alii* (1980) atendo-se ainda à afirmação de que a digestibilidade é afetada pelos polifenóis, quando o teor dos mesmos é bastante alto (PHILLIPS *et alii*, 1981).

A baixa digestibilidade das proteínas dos grãos de feijão, depois de tratados termicamente (JAFFÉ & VEGA LETTE, 1968) tem sido relacionada com a coloração da casca (JAFFÉ, 1980b; JAFFÉ & FLORES, 1975; ELIAS *et alii*, 1979; BRESSANI *et alii*, 1980; PHILLIPS *et alii*, 1981) usada como indicador do conteúdo de taninos (BARBARA & STARKEY, 1966; FEENEY, 1969; NELSON *et alii*, 1975; RAMACHANDRA *et alii*, 1977; MARQUARDT, 1977; WARD *et alii*, 1977) e com a presença de proteínas que por sua estruturação e/ou conformação espacial específica são resistentes à proteólise intestinal (SEIDL *et alii*, 1979; AL-HAG *et alii*, 1978; ROMERO & RYAN, 1978; LIENER & THOMPSON, 1980). Este trabalho mostrou pelas Figuras 15 e 16 (Fotos 8, 9 e 10) que o aquecimento dos grãos apesar de eliminar totalmente os efeitos danificadores às vilosidades intestinais, não evitou o esgotamento das células caliciformes, do seu conteúdo glicoprotéico que deve ser eliminado nas fezes e, sem dúvida, contribuir

para os baixos valores determinados para a digestibilidade da proteína dos feijões, deixando clara a necessidade de novos estudos que esclareçam a importância das perdas endógenas de proteína, bem como a natureza dos agentes causais dessas perdas.

8. CONCLUSÕES

Os grãos dos cultivares estudados, quando crus, podem levar ratos Wistar à morte em período de tempo relativamente curto (3,8 a 8,4 dias). A presença destes grãos é bastante prejudicial ao aproveitamento da ração e ao desenvolvimento dos animais, mesmo quando misturados com caseína, e este efeito evidencia-se pelos baixos índices de digestibilidade, valor biológico e utilização líquida da proteína (NPU).

Há um correlacionamento significativo entre a atividade hemaglutinante e a toxicidade dos grãos crus, o que não ocorre com a atividade antitriptica e o conteúdo de taninos.

O efeito tóxico das lectinas dos feijões está intimamente relacionado com sua interação com as vilosidades intestinais, resultando em um lesionamento, que se bastante intenso e prolongado leva os animais à morte, apesar da capacidade de adaptação e/ou recuperação, mostrada pelos animais, a este efeito antinutricional.

As proteínas de todos os cultivares estudados apresentaram-se deficientes em aminoácidos sulfurados e com teores elevados de lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina + tirosina e treonina, independente do uso de cromatografia gasosa ou de troca iônica (analisador de aminoácidos) na determinação. Este último método mostrou-se o mais satisfatório e adequado para o feijão.

A determinação do conteúdo de metionina, de grãos de feijão por cromatografia gasosa, tendo o BrCN como reagente (metionina potencialmente disponível) pode ser utilizada para avaliar o conteúdo de metionina biologicamente disponível, usando-se a equação de regressão da Figura 13.

A existência de correlação entre o conteúdo de enxofre total e os parâmetros nutricionais (NPR, ganho de peso/consumo de proteína) determinados com ratos, alimentados com grãos autoclavados, mostra a possibilidade de uso do conteúdo desse elemento como indicador do valor nutricional das proteínas do grão.

O tratamento térmico revelou-se mais uma vez bastante efetivo na melhoria do valor nutritivo das proteínas do grão de feijão, pois elimina a toxidez aguda das mesmas pela inativação das lectinas, tornando-as aptas a promover o crescimento dos ratos. Nos feijões estudados observou-se a existência, após este tratamento, de efeito dos mesmos sobre as células caliciformes da mucosa, resultando em elevada eliminação de muco (glicoproteínas) nas fezes, contribuindo para a determinação de baixos valores para a digestibilidade das proteínas.

O índice de valor protéico (NPR) utilizado nesta pesquisa não mostrou diferenças significativas entre os cultivares estudados.

9. LITERATURA CITADA

ABRAHÃO, I.O. Melhoramento do feijoeiro. Bragantia, 19(10): 129-161, 1960.

ABRAMOVA, E.P. & CHERNIKOV, M.P. Proteinase inhibitor content in the seeds of some leguminous seeds. Voprosy Pitaniya, 23: 13-16, 1964.

ALLAN, D. & CRUMPTON, M.J. Fractionation of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Biochem. Biophys. Res. Comm., 44: 1143-1148, 1971.

ALLEN, N.K. & BRILLIANTINE, L. A survey of hemagglutinins in various seeds. J. Immunol., 102: 1295-1299, 1969.

ALLEN, L.W.; SVENSON, R.H.; YACHNIN, S. Purification of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: Isolation of potent and weak phytohemagglutinin possessing mitogenic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 334-341, 1969.

ALLISON, J.B. The nutritive value of dietary proteins. In: MUMO, H.N. & ALLISON, J.B., ed. Mammalian protein metabolism. New York, Academic Press, 1964. V. 2 p. 45.

- AMAYA-FARFÁN, J.; YOUNG, C.T.; CHICHESTER, C.O. Automated de termination of tryptophan in legumes and cereals. J. Agr. Food Chem., 25: 139-141, 1977.
- ANDREWS, A.T. Navy (haricot) bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. Isolation and characterization of two components from a toxic agglutinating extract. Biochem. J., 139: 421-429, 1974.
- ANONIMO. Unusual outbreak of food poisoning. Brit. Med. J., 2: 1268, 1976.
- ANTUNES, A.J. & MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. J. Agric. Food Chem., 25: 1096-1098, 1977.
- ANTUNES, P.L. Composição e propriedades nutricionais das proteínas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*, L.). Campinas, FEA-UNICAMP, 1979. 166p. (Tese, Doutorado).
- ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V.C. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. J. Agric. Food Chem., 28: 935-938, 1980.
- ANTUNES, P.L.; SGARBIERI, V.C.; GARRUTI, R.S. Nutrification of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) by methionine infusion. J. Food Sci., 44: 1302-1305, 1979.
- A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 10 ed. Washington, A.O.A. C., 1965. 957p.

- A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11 ed. Washington, A. O.A.C., 1970. 1015p.
- A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12 ed. Washington, A.O.A.C., 1975. 948p.
- APOSTOLATOS, G. & HOFF, J.E. An improved method for the gas chromatographic determination of methionine in proteins and crude plant materials. Anal. Biochem., 118: 126-120, 1981.
- BAJAJ, S. Biological value of legume proteins as influenced by genetic variation. In: NUTRITIONAL IMPROVEMENT OF FOOD LEGUMES BY BREEDING, Roma, 1972. Proceedings, N. York, Protein Advisory Group of the United Nations System, 1973. p. 223-233.
- BALDI, G. & SALAMINI, F. Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species. Theor. Appl. Genetics, 43: 75-78, 1973.
- BANERJI, A.P. & SOHONIE, K. Trypsin inhibitor from field beans (*Dolichos lablab*). Isolation, purification, and properties of a trypsin inhibitor from field beans. Enzymologia, 36: 137-152, 1969.
- BARBARA, J. & STARKEY, R.L. Effect of plant tannins on decomposition of organic substances. Soil Sci., 101: 17-23, 1966.

- BARKA, T.E. & ANDERSON, P.S. Histochemistry, theory, practice and bibliography. N. York, Harper & Row, 1963. 978p.
- BAUNGARTNER, B. & CHRISPEELS, M.J. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. Plant Physiol., 58: 1-6, 1976.
- BECKER, H.C.; MILNER, R.T.; NAGEL, R.H. A method for the determination of nonprotein nitrogen in soybean meal. Cereal Chem., 17: 447-457, 1940.
- BECKMAN INSTRUMENTS. How to make a protein hydrolyzate analysis with the model 120C amino acid analyzer. Stanford Park, Palo Alto, California, Spinco Division Beckman Instruments, 1966. (Procedures manual 120-PM-1).
- BELITZ, H.D. & FUCHS, A. Complexes of a *Phaseolus vulgaris* inhibitor with α and β -trypsin. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1: 132-134, 1972.
- BELITZ, H.D. & FUCHS, A. Die reaktiven zentren des trypsin-chymotrypsin-inhibitors PVI3 aus *Phaseolus vulgaris* var. Nanus. Z. Lebensm. Unters. Forch., 152: 129-133, 1973.
- BENDER, A.E. & DOELL, B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. Brit. J. Nutr., 11: 138-144, 1957.
- BENDER, A.E. & MOHAMMADIHA, H. Low digestibility of legume ni

- trogen. Proceedings of the Nutrition Society, 40: 66A, 1981.
- BIRK, Y. Tripsin isoinhibitors from garden beans (*Phaseolus vulgaris*). In: LASZLO, L., ed. Methods in Enzymology, 45, Part B. Academic Press, New York, 1976. p. 710-716.
- BOONVISUT, S. & WHITAKER, J.R. Effect of heat, amylase and disulfide bond cleavage on the "in vitro" digestibility of soybean proteins. J. Agric. Food Chem., 24: 1130-1135, 1976.
- BOYD, W.C. Introduction to Immunochemical Specificity. New York, Wiley Interscience, 1962. 158p.
- BOYD, W.C. The lectins: Their present status. Vox Sang, 8: 1-32, 1963.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Diagnosis of subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (lectins). J. Lab. Clin. Med., 44: 235-237, 1954a.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of plant agglutinin (lectin). Blood, 9: 1195-1198, 1954b.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E.; MC MASTER, M. Immunochemical behavior of a plant agglutinin (lectin). Arch. Biochem. Biophys., 55: 226-234, 1955.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; NAVARETTE, D.A. The essential amino acid content of samples of black beans, red beans, and cowpea

of Guatemala. J. Food Sci., 26: 525-528, 1961.

BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; VALIENTE, A.T. Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). Brit. J. Nutr., 17: 69-78, 1963.

BRESSANI, R.; BRAHAM, J.E.; ELIAS, L.G. Conteúdo de polifenoles en cultivares de frijol comum (*P. vulgaris*) y efecto sobre la digestibilidad de la proteína. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE NUTRICIÓN, 5º. Puebla, Mexico, 1980. Resumos. México, Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 1980. p. 44.

BRÜCHER, O.; WECKSLER, M.; LEVY, A.; POLOZZO, A.; JAFFÉ, W.G. Comparison of phytohemagglutinins in wild beans (*Phaseolus aborigineus*) and in common beans (*Phaseolus vulgaris*) and their inheritance. Phytochemistry, 8: 1739-1743, 1969.

BRÜCHER, O.; PALOZZO, A.; JAFFÉ, W.G. Detection of four different types of hemagglutinins in beans (*Phaseolus vulgaris*). Z. Immunitätsforsch., 142: 439-442, 1972.

BUTLER, L.G.; RIEDL, D.J.; LEBRYK, D.G.; BLYTT, H.J. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. JAACS, 61(5): 916-920, 1984.

CARMONA, B.A. & JAFFÉ, W.G. Aislamiento y caracterización parcial de los taninos de *Phaseolus vulgaris*. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE NUTRICIÓN, 5º, Puebla, México, 1980. Resumos.

Mexico, Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 1980. p. 43.

COULET, M.; MUSTIER, J.; GUILLOT, J. Hemagglutinins of fungi.

Rev. Mycol., 35: 71-89, 1970.

CHU, H.M.; LO, S.S.; JEN, M.H.; CHI, C.W.; TSAO, T.C. Trypsin

inhibitor from mung bean. II. Relation between component A and B and some chemical characteristics of the inhibitor. Acta Biochem. Biophys. Sin., 4: 588-597, 1964.

DAHLGREN, K.; PORATH, J.; LINDAHL-KIESSLING, K. On the purification of phytohemagglutinins from *Phaseolus vulgaris* seeds.

Arch. Biochem. Biophys., 137: 306-314, 1970.

DE MUELENAERE, H.J.H. Toxicity and haemagglutinating activity of legumes. Nature, 206: 827-828, 1965.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356, 1956.

EL-HAG, N.; HAARD, N.F.; MORSE, R.E. Influence of sprouting on the digestibility coefficient, trypsin inhibitor, and globulin proteins of red kidney beans. J. Food Sci., 43: 1874-1875, 1978.

ELIAS, L.G.; DE FERNANDEZ, D.G.; BRESSANI, R. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of beans protein. J. Food Sci., 44: 524-527, 1979.

ELLINGER, G.M. A chemical approach to the nutritional availability of methionine in food proteins. Ann. Nutr. Alim., 32: 281-289, 1978.

ETZLER, M.E. & BRANSTATOR, M.L. Differential localization of cell surface and secretory components in rat intestinal epithelium by use of lectins. J. Cell. Biol., 62: 329, 1974.

EVANS, R.J. & BANDEMER, S.L. Nutritive value of legume seed proteins. J. Agric. Food Chem., 15: 439-443, 1967.

EVANS, R.J. & BAUER, D.H. Studies of the poor utilization of the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). J. Agric. Food Chem., 26: 779-788, 1978.

EVANS, I.M. & BOULTER, D. Chemical methods suitable for screening for protein content and quality in cowpea (*Vigna unguiculata*) meals. J. Sci. Food. Agric., 25: 311-322, 1974.

EVANS, I.M. & BOULTER, D. S-Methyl-L-cystine content of various legume meals. Qual. Plant. - Plant Foods Hum. Nutr., 24: 257-261, 1975.

EVANS, R.J.; PUSZTAI, A.; WATT, W.B.; BAUER, D.A. Isolation and properties of protein fractions from navy beans (*Phaseolus vulgaris*) which inhibit growth of rats. Biochem. Biophys. Acta, 303: 175-184, 1973.

EVANS, R.J.; BAUER, D.H.; SISAK, K.A.; RYAN, P.A. The availability for the rat of methionine and cystine contained in dry

- bean seed. J. Agric. Food Chem., 22: 130-133, 1974.
- FAO/OMS. Necessidades de energia y de proteínas. Roma, Informe de un Comité Especial Mixto FAO/OMS de Expertos, 1973. 118p. (FAO Nutrition Meetings Report Series, 52).
- FEENEY, P.P. Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsin. Phytochemistry, 8: 2119-2126, 1969.
- FIGUEROA, M.O.R.; MANCINI FILHO, J.; LAJOLO, F.M. Efeito das fito-hemaglutininas dos feijões Jalo e Rico-23 sobre as atividades da maltase e da invertase da mucosa intestinal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 59, Viçosa. 1981. Resumos. Universidade Federal de Viçosa, 1981. p. 167.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; BEAN, R.C.; DUCAY, E.D.; OLCOTT, H.S. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from lima beans. Arch. Biochem. Biophys., 37: 393-407, 1952.
- FRIEDMAN, M., ed. Protein nutritional quality of foods and feeds. New York, Marcel Dekker, 1975. V. 1., p. 1-2.
- FUJITA, Y.; OISHI, K.; AIDA, C. A novel hemagglutinin produced by *Aspergillus niger*. J. Biochem. (Tokyo), 76: 1347-1349, 1974.
- GILBOA-GARBER, N. Purification and properties of hemaggluti

- nin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells. Biochem. Biophys. Acta, 273: 165-173, 1972.
- GODDARD, V.R. & MENDEL, L.B. Plant hemagglutinins with special reference to a preparation from navy bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Biol. Chem., 82: 447-463, 1929.
- GREEN, G.M. & LYMAN, R.L. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 140: 6-12, 1972.
- GRIEBEL, C. Erkrankungen durch Bohnenflocken (*Phaseolus vulgaris*, L.) und Platterbsen (*Lathyrus tingitanus*, L.). Z. Lebensm.-Untersuch Forsch., 90: 191-197, 1950.
- HACKLER, L.R. & DICKSON, M.H. A comparison of amino acid and nitrogen content of pods and seeds of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). Geneva, N. York, 1972. 5p. (Research Bulletin, 3).
- HAGERMAN, A.E. & BUTLER, L.G. Condensed tannin purification and characterization of tannin associated proteins. J. Agric. Food Chem., 28: 947-952, 1980.
- HARA, T.; TSUKAMOTO, I.; MIYOSHI, M. Oral toxicity of kintoki bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 29: 589-599, 1983.
- HEWITT, D.; COATES, M.E.; KAKADE, M.L.; LIENER, I.E. A compa

- rison of fractions prepared from navy (haricot) beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) in diets for germ-free and conventional chicks. Br. J. Nutr., 29: 423-435, 1973.
- HÖGLUND, S. & DAHLGREN, K. On the morphology of phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* seeds. Eur. J. Biochem., 17: 23-26, 1970.
- HONOVAR, P.M.; SHIH, C.V.; LIENER, I.E. Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. J. Nutr., 77: 109-114, 1962.
- HOWARD, I.K.; SAGE, H.J.; HORTON, C.B. Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. Arch. Biochem. Biophys., 149: 323-326, 1972.
- HOWE, M.L. & BARRETT, J.T. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. Biochem. Biophys. Acta, 215: 97-104, 1970.
- HUNGERFORD, D.A.; DONNELLY, A.J.; NOWELL, P.C.; BECK, S. The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. Am. J. Hum. Genet., 11: 215-236, 1959.
- IRRMAN, M.A.K. Determination of aminoacids by gas chromatography. J. Chromatography, 97: 175-179, 1974.
- JAFFÉ, W.G. The comparative biological value of some legumes of importance in the Venezuelan diet. Arch. Venezol. Nutr.,

1: 107-126, 1950a.

JAFFÉ, W.G. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 75: 219-220, 1950b.

JAFFÉ, W.G. Über phytotoxine aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*). Arzneim.Forsch., 10: 1012-1016, 1960.

JAFFÉ, W.G. Blutagglutinierende and toxische Eiweissfraktionen aus Bohnen. Experientia, 18: 76-77, 1962.

JAFFÉ, W.G. Factores toxicos en leguminosas. Arch. Latinoam. Nutr., 18: 205-218, 1968.

JAFFÉ, W.G. Factors affecting the nutritional value of beans. In: NUTRITIONAL IMPROVEMENT OF FOOD LEGUMES BY BREEDING, Roma, 1972. Proceedings, N. York, Protein Advisory Group of the United Nations System, 1973. p. 43-48.

JAFFÉ, W.G. Hemagglutinins (lectins). In: LIENER, I., ed. Toxic constituents of foodstuffs. 2nd ed. Academic Press, N. Y., 1980. p. 73-102.

JAFFÉ, W.G. & FLORES, M.F. Cocción de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr., 25: 79-90, 1975.

JAFFÉ, W.G. & HANNIG, K. Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Biochem. Biophys., 109: 80-91, 1965.

JAFFÉ, W.G. & CAMEJO, G. La acción de una proteína toxica aislada de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*) sobre la absorción intestinal in ratas. Acta Cient. Venezol., 12: 59-61, 1961.

JAFFÉ, W.G. & VEGA LETTE, C.L. Heat-labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Nutr., 94: 203-210, 1968.

JAFFÉ, W.G. & BRÜCHER, O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr., 22: 267-281, 1972.

JAFFÉ, W.G. & BRÜCHER, O. El contenido de nitrógeno total y aminoácidos azufrados en diferentes líneas de frijoles. (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr., 24: 107-113, 1974.

JAFFÉ, W.G.; PLANCHART, A.; PAE PUMAR, J.I.; TORREALBA, R.; FRANCESCHI, D.N. Nuevos estudios sobre un factor toxico de las caraotas crudas (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Venezol. Nutr., 6: 195-205, 1955.

JAFFÉ, W.G.; BRÜCHER, O.; PALLOZZO, O. Detection of four types of specific phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). Z. Immunitätsforsch., Exp. Klin. Immunol., 142: 439-447, 1972.

JAMIESON, G.A. Glycoprotein structure of human transferrin and ceruloplasmin. Protides Biol. Fluids., 14: 71-74, 1966.

- JAYNE-WILLIAMS, D.J. The influence of dietary jack beans (*Canavalia ensiformis*) and of concanavalin A on the growth of conventional and quaternary Japanese quail (*Coturnix japonica*). Nature (London), New Biol., 243: 150-151, 1973.
- JAYNE-WILLIAMS, D.J. & BURGESS, C.D. Further observations on the toxicity of navy beans (*Phaseolus vulgaris*) for Japanese quail (*Coturnix japonica*). J. Appl. Bacteriol., 37: 149-169, 1974.
- JONES, G.; MOORE, S.; STEIN, W.H. Properties of chromatographically purified trypsin inhibitors from lima beans. Biochemistry, 2: 66-71, 1963.
- JOSLYN, M.A. Methods in food analysis: physical, chemical and instrumental methods of analysis. 2 ed. N. York, Academic Press, 1970. 845p.
- JUNQUEIRA, R.G. Purificação e propriedades de hemaglutininas de uma variedade brasileira de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Campinas, FEA-UNICAMP, 1979. 83p. (Tese, Mestrado).
- JUNQUEIRA, R.G. & SGARBIERI, V.C. Isolation and general properties of lectins from the bean (*Phaseolus vulgaris*, L. var. Rosinha G2). J. Food Biochem., 5: 165-179, 1981.
- KAIFU, R. & OSAWA, T. Synthesis of O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-D-mannose and its interaction with various lectins. Carbohydr. Res., 52: 179-185, 1976.

- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. Growth inhibition of rats fed navy bean fractions. J. Agric. Food Chem., 13: 450-454, 1965a.
- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. Nutritive value of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). Brit. J. Nutr., 19: 269-276, 1965b.
- KAKADE, M.L.; SIMONS, N.; LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chem., 46: 518-526, 1969a.
- KAKADE, M.L.; ARNOLD, R.L.; LIENER, I.E.; WAIBEL, P.E. Unavailability of cystine from trypsin inhibitors as a factor contributing to the poor nutritive value of navy beans, J. Nutr., 99: 34-42, 1969b.
- KAKADE, M.L.; HOFFA, D.E.; LIENER, I.E. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soy beans fed to rats. J. Nutr., 103: 1772-1778, 1973.
- KANESIRO, M.A.B.; FALEIROS, R.R.S.; BELLINGIERI, P.A.; ALBERTINI, P.E.G. Metabolismo nitrogenado em *Lycopersicon esculentum* Mill, cultivar Roma VF (tomateiro) cultivado em vaso. IV-Variação dos teores de carboidratos. Científica, 5: 276-280, 1977.
- KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). Econ. Bot., 19: 358-368, 1965.
- KAPOOR, A.C. & GUPTA, Y.P. Trypsin inhibitor activity in soy bean seed as influenced by stage of its development and dif

- ferent treatments and the distribution in its anatomical parts. Indian J. Nutr. Diet., 15: 429-433, 1978.
- KELLY, J.F. Genetic variation in the methionine levels of mature seeds of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci., 96: 561-563, 1971.
- KELLY, J.F. Increasing protein quantity and quality. In: NUTRITIONAL IMPROVEMENT OF FOOD LEGUMES BY BREEDING, Roma, 1972. Proceedings, N.York. Protein Advisory Group of the United Nations System, 1973. p. 179-184.
- KHAYAMBASHI, H. & LYMAN, R.L. Secretion of rat pancreas perfused with plasma from rats fed soybean trypsin inhibitor. Am. J. Physiol., 217: 646-651, 1969.
- KHALAP, S.; THOMPSON, T.E.; GOLD, E.R. Hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions of extracts from snails and sponges. Vox Sang., 18: 501-526, 1970.
- KING, K.W. Development of all plant food mixture using crops indigenous to Haiti: amino acid composition and protein quality. Econ. Bot., 18: 311-322, 1964.
- KORNFELD, S. & KORNFELD, R. Solubilization and partial characterization of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 1439 - 1446, 1969.
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S. The structure of a phytohemagglu-

tinin receptor site from human erythrocytes. J. Biol. Chem., 245: 2536-2545, 1970.

KORNFELD, R. & KORNFELD, S. Structure of membrane receptors for plant lectins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 234: 276 - 282, 1974.

KORNFELD, R.; KELLER, J.; BAENZIGER, J.; KORNFELD, S. The structure of the glycopeptide of human γ G, myeloma proteins. J. Biol. Chem., 246: 3259-3268, 1971.

KORNFELD, R.; GREGORY, W.G.; KORNFELD, S.A. Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) phytohemagglutinin. In: GINSBURG, V., ed. Methods in Enzymology, 28, Part B. Academic Press, N. York, 1972. p. 344-349.

KORTE, R. Heat resistance of phytohemagglutinins in weaning food mixtures containing beans (*Phaseolus vulgaris*). Ecol. Food Nutr., 1: 303-307, 1972.

KOTHBAUER, H. & SCHENKEL-BRUNNER, H. Hemagglutinins in fish eggs: Comparative studies on different *Salmonidae* species. Comp. Biochem. Physiol. A., 50A: 27-29, 1975.

KOZŁOWSKA, H.; BOROWSKI, J.; ELKOWICZ, K. Correlation between the activity of trypsin inhibitors and the protein content in soybean products. Zesz. Nawk. Akad. Roln. Tech. Olsztynie, Technol. Żywn., 10: 47-52, 1976 apud Chem. Abstr. 88:5001C, 1978.

- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30: 291-310, 1947.
- LESENEY, A.M.; BOURRILLON, R.; KORNFELD, S. The nature of the erythrocyte receptor site of *Robinia pseudoaccacia* phytohemagglutinin. Arch. Biochem. Biophys., 153: 831-836, 1972.
- LEVINE, P.M.; CELANO, J.; LANCE, S.; BERLINER, V. On anti-M in horse sera. Vox Sang. 2: 433-439, 1957.
- LIENER, I.E. The photometric determination of hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. Arch. Biochem. Biophys., 54: 223-227, 1955.
- LIENER, I.E. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Am. J. Clin. Nutr., 11: 281-298, 1962.
- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins: Their nutritional significance. J. Agric. Food Chem., 22: 17-22, 1974.
- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins). Annu. Rev. Plant Physiol., 27: 291-319, 1976.
- LIENER, I.E. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. J. Am. Oil.Chem. Soc., 56: 121-129, 1979.
- LIENER, I.E. & THOMPSON, R.M. "In vitro" and "in vivo" studies on the digestibility of the major storage protein of the navy

bean (*Phaseolus vulgaris*). Qual. Plant. - Plant Foods Hum. Nutr., 30: 13-25, 1980.

LIMA, A.L.; MANCINI Fº, J.; DOMINGUES, J.B.; LAJOLO, F.M. Propriedades hemaglutinante, mitogênica e tóxica de variedades brasileiras de feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.). Rev. Farm. Bioquim. (USP), 16: 145-154, 1980.

LÜNING, O. & BARTELS, W. Über die giftegekeit der weissen Bohnen. Z. Unters. Lebensm., 51: 220-228, 1926.

LYMAN, R.L.; OLDS, B.A.; GREEN, G.M. Chymotrypsinogen in the intestine of rats fed soybean trypsin inhibitor and its inability to suppress pancreatic enzyme secretion. J. Nutr., 104: 105-110, 1974.

MANCINI FILHO, J. & LAJOLO, F.M. Fatores antinutricionais em diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Ciência e Cultura, 33(1): 94-97, 1981.

MARQUARDT, R.R.; WARD, A.T.; CAPBELL, L.D.; CANSFIELD, P.E. Purification, identification and characterization of growth inhibitors in faba beans (*Vicia faba*, L. var. Minor). J. Nutr., 107: 1313-1324, 1977.

MARQUEZ, U.M.L. & LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. J. Agric. Food Sci., 29(5): 1068-1974, 1981.

McINTOSH, A. & ELLINGER, G.M. Determination of methionine in the seeds of legumes. Proc. Nutr. Soc., 35: 148A, 1976.

MEHANSHO, H.; HAGERMAN, A.E.; CLEMENTS, S.; BUTLER, L.; ROGLER, J.; CARLSON, D.M. Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA-Biochemistry, 80: 3948-3952, 1983.

MIALONIER, O.; PRIVAT, J.P.; MONSIGNY, M.; KAHLEN, G.; DURAND, R. Isolement, propriétés physico-chimiques et localisation "in vivo" d'une phytohemagglutinine (lectine) de *Phaseolus vulgaris*, L. (var. rouge). Physiol. Veg., 11: 519-537, 1973.

MILLER, J.B.; NOYES, C.; HEINRIKSON, R.; KINGDON, H.S.; YACHNIN, S. Phytohemagglutinin mitogenic proteins. J. Expl. Med., 138: 939-951, 1973.

MILLER, J.B.; HSU, W.; HEINRIKSON, R.; YACHNIN, S. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 1388-1391, 1975.

MORAES, R.M. & ANGELUCCI, E. Chemical composition and amino acid contents of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 36: 493-494, 1971.

MORAES e SANTOS, T. & DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Valor nutritivo

de frações protéicas isoladas de feijão (*Phaseolus vulgaris*).
Arch. Latinoam. Nutr., 22: 547-560, 1972.

MOREIRA, R.A. & PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol., 59: 783-787, 1977.

MORGAN, W.T.J. & WATKINS, W.M. The product of the human blood group A and B genes in individuals belonging to group AB. Nature, 177: 521-522, 1956.

NBC (Nutritional Biochemicals Corporation). Diet Catalog of the ICN. Cleveland, Ohio, NBC, 1977 e 1978. 24p.

NELSON, T.S.; STEPHENSON, E.L.; BURGOS, A.; FLOYD, J.; YORK, J.O. Effect of tannin content and dry matter digestion on energy utilization and average amino acid availability of hybrid sorghum grains. Poultry. Sci., 54: 1620-1623, 1975.

NORDMAN, C.T.; CHAPELLE, A. de la; GRÄSBECK, R. The interrelations of erythroagglutinating, leucoagglutinating and leucocyte-mitogenic activities in *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin. Acta. Med. Scand. Suppl., 412: 49-58, 1964.

NOWAKOVÁ, N. & KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins. XX. Isolation and characterization of hemagglutinins from scarlet runner seeds (*Phaseolus coccineus*). Biochem. Biophys. Acta, 359: 320-333, 1974.

NOWELL, P.C. Differentiation of human leukemic leucocytes in

- tissue culture. Exp. Cell. Res., 19: 267-277, 1960a.
- NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res., 20: 462-466, 1960b.
- NUNGESTER, W.J. & VAN HALSEMA, G. Reaction of certain agglutinins with Flexner-Jobling carcinoma cells of the rat. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 83: 863-866, 1953.
- OH, Y.H. & CONARD, R.A. Further studies on mitogenic components of *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin: subunit structure. Arch. Biochem. Biophys., 152: 631-637, 1972.
- OSBORNE, T.B. The proteids of the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Am. Chem. Soc., 16: 633-643; 703-712, 757-764, 1894.
- PALMER, R.; MCINTOSH, A.; PUSZTAI, A. The nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). The effect on nutritional value of seed germination and changes in trypsin inhibitor content. J. Sci. Food Agric., 24: 937-944, 1973.
- PALOZZO, A.C. & JAFFÉ, W.G. Immuno-electrophoretic studies with bean proteins. Phytochemistry, 8: 1255-1258, 1969.
- 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 protein. J. Sci. Food Agric., 32: 423-432, 1981.

- PORTER, W.M.; AXTELL, J.; KEIM, W.F. Quantitative relation ships between total sulfur and methionine and cystine in legu mes. In: NUTRITIONAL IMPROVEMENT OF FOOD LEGUMES BY BREEDING, Roma, 1972. Proceedings, N. York, Protein Advisory Group of the United Nations System, 1973. p. 319-320.
- PUSZTAI, A. The isolation of two proteins, glycoprotein I and a trypsin inhibitor, from the seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). Biochem. J., 101: 379-384, 1966.
- PUSZTAI, A. Studies on the extraction of nitrogenous and phos phorus containing materials from seeds of kidney beans (*Pha seolus vulgaris*). Biochem. J., 94: 611-616, 1967.
- PUSZTAI, A. General properties of a protease inhibitor from the seeds of kidney beans. Eur. J. Biochem., 5: 252 - 259, 1968.
- PUSZTAI, A. & PALMER, R. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): The toxic principle. J. Sci. Food Agric., 28: 620-623, 1977.
- PUSZTAI, A. & WATT, W.B. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*, a comprehensive study of fractionation. Biochem. Biophys. Acta, 365: 57-71, 1974.
- PUSZTAI, A. & STEWART, J.C. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*: Physicochemical studies. Biochem. Biophys. Acta, 536: 38-49, 1978.

- PUSZTAI, A.; GRANT, G.; PALMER, R. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): The isolation and partial characterization of toxic constituents. J. Sci. Food Agric., 26: 149-156, 1975.
- PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W.; KING, T.P. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Proc. Nutr. Soc., 38: 115-120, 1979a.
- PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W.; KING, T.P.; STEWART, J.C. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): Chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. J. Sci. Food Agric., 30: 843-848, 1979b.
- PUSZTAI, A.; CROY, R.R.D.; STEWART, J.S.; WATT, W.B. Protein body membranes of *Phaseolus vulgaris*, cultivar Processor cotyledons: Isolation and preliminary characterization of constituent proteins. New Phytol., 83: 371-378, 1979c.
- RACKIS, J.J. Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chemists Soc., 51: 161A-174A, 1974.
- RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T.K.; SHADAKSHARASWAMY, M. Relationship between tannin levels and "in vitro" protein digestibility in finger millet (*Eleusine coracana*, Gaertn.). J. Agric. Food Chem., 25: 1101-1104, 1977.
- RÄSÄNEN, V.; WEBER, T.H.; GRÄSBECK, P. Crystalline kidney bean leucoagglutinin. Eur. J. Biochem., 38: 193-200, 1973.

- RATTRAY, E.A.S.; PALMER, R.; PUSZTAI, A. Toxicity of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) to conventional and gnotobiotic rats. J. Sci. Food Agri., 25: 1035-1040, 1974.
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. Phytochemistry, 16: 159-169, 1977.
- RIGAS, D.A. & OSGOOD, E.E. Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. J. Biol. Chem. 212: 607-615, 1955.
- ROBERTS, T.K. & BOURNSNELL, J.C. The inhibitory action of phosphatidyl compounds on boar seminal hemagglutinin. J. Reprod. Fertil., 41: 489-492, 1974.
- ROGERS, Q,R. & HARPER, A.E. Amino acid diets and maximal growth in the rat. J. Nutrition, 87: 267-273, 1965.
- ROMERO, J. & RYAN, D.S. Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L., to "in vitro" enzymatic hydrolysis. J. Agric. Food Chem., 26: 784-788, 1978.
- ROSSI, M.A.; MANCINI FILHO, J.; LAJOLO, F.M. Jejunal ultra-structural changes induced by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in rats. Br. J. Exp. Path., 65: 117-123, 1984.
- ROUGÉ, P. Etude de la phytohémagglutinine de graines de lentille au cours de la germination, et des premiers stades du déve

loppement de la plante. Evolution dans le cotylédons. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D 278: 449-452, 1974a.

ROUGÉ, P. Etude de la phytohémagglutinine de graines de lentil le au cours de la germination et des premiers stades du développement de la plante. Evolution dans les racines, les tiges et les feuilles. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D 278: 3083-3086, 1974b.

RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Annu. Rev. Plant. Physiol., 24: 173-196, 1973.

SAINT-PAUL, M.; DOUGLAS-Le BOURDELLES, F.; FINE, J.M. Contribution a l'étude biochimique de l'hémagglutinine de *Phaseolus vulgaris*. Compt. Rend. Hebd. Seances Soc. Biol., 150: 1742. 1747, 1956.

SAINT-PAUL, M. Les hémagglutinines végétales. Transfusion, 4: 3-37, 1961.

SAVAIANO, D.A.; POWERS, J.R.; COSTELLO, M.J.; WHITAKER, J. R.; CLIFFORD, A.J. The effect of an α - amilase inhibitor on the growth rate of weanling rate. Nutr. Reports Int., 15: 443-449, 1977.

SCHEEMAN, B.O. & LYMAN, R.L. Factors involved in the intestinal feed back regulation of pancreatic enzyme secretion in the rat. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 148: 897-903, 1975.

SCHNEIDER, E.C. The hemagglutinating and precipitating properties of the great northern bean (*Phaseolus*). J. Biol. Chem., 11: 47-59, 1911.

SCHWARZFISCHER, V.F. & LEIBRICH, K. Populations-genetische untersuchungen über das blutkörperchenmerkmal. Gy. Blut, 8: 161-166, 1962.

SCOTT, M.T. Partial characterization of the hemagglutinating activity in hemolymph of the American cockroach (*Periplaneta americana*). J. Invert. Pathol., 19: 66-71, 1972.

SEEGER, R. & WEIDMANN, R. Zum vorkommen von hämolysinen und agglutininen in höheren Pilzen (Basidiomyceten). Arch. Toxikol., 29: 189-217, 1972.

SEIDL, D.; JAFFÉ, M.; JAFFÉ, W.G. Digestibility and proteinase inhibitory action of a kidney bean globulin. J. Agric. Food Chem., 17: 1318-1321, 1969.

SELA, B.A.; LIS, H.; SHARON, N.; SACHS, L. Isolectins from wax bean with differential agglutination of normal and transformed mammalian cells. Biochem. Biophys. Acta, 310: 273-277, 1973.

SGARBIERI, V.C. Propriedades físico-químicas e nutricionais de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), variedade Rosinha G2. Campinas, FEA-UNICAMP, 1979. 207p. (Tese, Livre Docência).

- SGARBIERI, V.C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas de sementes de plantas leguminosas. Ciência e Cultura, 32: 78-84, 1980.
- SGARBIERI, V.C. & WHITAKER, J.R. Partial characterization of trypsin-chymotrypsin inhibitors from bean (*Phaseolus vulgaris*, L. var. Rosinha G2): Chemical and physical characteristics. J. Food Biochem., 5: 215-232, 1981.
- SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L.; ALMEIDA, L.D. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). J. Food Sci., 44: 1306-1308, 1979.
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science, 177: 949-959, 1972.
- SMITH, C.R. Jr.; EARLE, F.R.; WOLFF, I.A.; JONES, Q. Comparison of solubility characteristics of selected seed proteins. J. Agric. Food Chem., 7: 133-135, 1959.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Analyt. Chem., 30: 1190-1197, 1958.
- SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. Analytical Chemistry, 39: 1412-1416, 1967.
- SPIRO, R.G. Periodate oxidation of the glycoprotein fetuin. J. Biol. Chem., 239: 567-573, 1964.

STEAD, R.H.; DE MUELENAERE, H.J.H.; QUICKE, C.V. Trypsin inhibition, hemagglutination and intraperitoneal toxicity of extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*. Arch. Biochem. Biophys., 113: 703-708, 1966.

STOCKERT, R.J.; MORRELL, A.G.; SCHEINBERG, I.H. Mammalian hysatic lectin. Science, 186: 365-366, 1974.

SUSPLUGAS, J. & COULET, M. Repartition de l'hémagglutinine du *Phaseolus vulgaris* L., spécialement au moment de la germination. Soc. Pharm. Montpellier, 10: 125-132, 1954.

TABATABAI, M.A. & BREMMER, J.M. A simple turbidimetric method of determining total sulfur in plant materials. Agronomy J., 62: 805-807, 1970.

TAKAHASHI, T.; RAMACHANDRAMURTHY, P.; LIENER, I.E. Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. Biochem. Biophys. Acta, 133: 123-133, 1967.

TAKAHASHI, T. & LIENER, I.E. Isolation and composition of a glycopeptide from a phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. Biochem. Biophys. Acta., 154: 560-564, 1968.

TANDON, O.B.; BRESSANI, R.; SCHRIMSHAW, N.S.; LE BEAU, F. Nutritive value of beans. Nutrients in Central American beans. J. Agric. Food Chem., 5: 137-142, 1957.

TOBIN, G. & CARPENTER, K.J. The nutritional value of the dry

- bean (*Phaseolus vulgaris*): A literature review. Nutrition Abstracts and Reviews - Series A. Human and experimental, 48(11): 919-936, 1978.
- TOMS, G.C. & WESTERN, A. Phytohemagglutinins. In: HARBORNE, J.B.; BOULTER, D.; TURNER, B.L., eds. Chemotaxonomy of leguminosae. New York, Academic Press, 1971. p. 367-462.
- ULENBRUCK, G.; WINTZER, G.; SALFNER, B.; SCHUMACHER, K.; OERKERMANN, H.; HIRCHMANN, W.D.; ALZER, G. Studies on the nature of the PHA receptor. Klin. Wochenschr., 48: 1369 - 1370, 1970.
- WAGNER, L.P. & RIEHM, J.P. Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor isolated from the navy bean. Arch. Biochem. Biophys., 121: 672-676, 1967.
- WANG, D. A crystalline protein-proteinase inhibitor from pinto bean seeds. Biochem. Biophys. Acta, 393: 583-596, 1975.
- WARD, A.T.; MARQUARDT, R.R.; CAMPBELL, L.D. Further studies on the isolation of thermolabile growth inhibitor from faba bean (*Vicia faba*, L., var. Minor). J. Nutr., 107: 1325-1334, 1977.
- WARNER, R.G. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: NAS/NRC. Nutritional requirements of the laboratory rats. Washington, DC. NAS/NRC, 1962. p. 51-81. (Pub., 990).
- WATERMAN, H.C.; JOHNS, C.O.; JONES, D.B. Conphaseolin. A new globulin from the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Biol.

Chem., 55: 93-104, 1923.

WEBB, J.M. & LEVY, H.B. New development in the chemical determination of nucleic acids. In: GLICK, D., ed. Methods of Biochemical Analysis. New York, Interscience, 1958. V. 6. p. 1-30.

WEBER, T.H. Isolation and characterization of a lymphocyte-stimulating leucoagglutinin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) Scand. J. Clin. Lab. Invest., 24: Suppl. 111, 1-80, 1969.

WEBER, T. & GRÄSBECK, R. Physicochemical characterization of a lymphocyte-stimulating leucoagglutinin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21: Suppl. 101, 14, 1968.

WEBER, T.W.; ARO, H.; NORDMAN, C.T. Characterization of lymphocyte stimulating blood cell-agglutinating glycoproteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Biochem. Biophys. Acta, 263: 94-105, 1972.

WEINHAUS, O. Zur biochemie des phasins. Biochem. Z., 18: 228-228-260, 1909.

WHITAKER, J.R. Naturally occurring peptide and protein inhibitors of enzymes. In: AYRES, J.C. & KIRSCHMAN, J.E., eds. Impact of Toxicology on Food Processing. AVI Press, Westport, Conn., 1981. p. 57-104.

- WHITAKER, J.R. & SGARBIERI, V.C. Purification and composition of the trypsin-chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris*, L. var. Rosinha G2. J. Food Biochem., 5: 197-213, 1981.
- WHITLEY, E.J., Jr. & BOWMAN, D.E. Isolation and properties of navy bean proteinase inhibitor component I. Arch. Biochem. Biophys., 169: 42-50, 1975.
- WILSON, K.A. & LASKOWSKI, M., Sr. Isolation of three isoinhibitors of trypsin from garden bean, *Phaseolus vulgaris*, having either lysine or arginine at the reactive site. J. Biol. Chem., 248: 756-762, 1973.
- YACHNIN, S. & SVENSON, R.H. The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. Immunology, 22: 871-883, 1972.
- YACHNIN, S.; ALLEN, L.W.; BARON, J.M.; SVENSON, R.H. The potentiation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation by cell-cell interaction; a matrix hypothesis. Cell Immunol., 3: 569-589, 1972.
- YAMAMOTO, M. & IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. I. Purification and characterization of two soybean trypsin inhibitors. J. Biochem. (Tokyo), 62: 141-149, 1967.
- ZUCAS, S.M.; LOURENÇO, E.J.; CAMPOS, M.A.P. Os feijões - seu valor nutritivo e substâncias indesejáveis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO FEIJÃO, 1º, Campinas, 1971. Anais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1972. vol. 2. p. 539-570.