



**UNICAMP**

**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA**

**COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DAS  
PROTEÍNAS DO FEIJÃO ROSINHA G2 (*Phaseolus vulgaris*, L.)**

**PEDRO LUIZ ANTUNES**  
Engº Agrônomo

*C. F. Lombardi*  
**VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI, Ph.D.**  
Orientador

Tese apresentada à **FEAA/UNICAMP** para Doutorado em  
Ciências de Alimentos.

**CAMPINAS-1979**

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Valdemiro Carlos Sgarbieri, por sua orientação inteligente, objetiva, sempre presente e, especialmente, pela amizade.

Ao Professor André Tosello, Diretor da FEAA/UNICAMP e do Curso de Pós-Graduação, pelo dimensionamento técnico-científico que caracteriza sua atuação.

Ao Professor Guido Kaster, Vice-Reitor da UFPEL, pelo apoio e incentivo em cada etapa deste trabalho.

Ao PICD/CAPES e à Universidade Federal de Pelotas, pelo suporte financeiro e facilidades.

A todos os Professores que participaram do Curso, em especial a Spiros M. Constantinides, Leopold Hartman, Ruth S. Garruti, José Luiz V. Rocha, Ottilio Guernelli, Jaime Amaya-F., bem como ao Dr. Luiz D'Artagnan de Almeida e a Astrid Sgarbieri.

A meus amigos Aldonir Bilhalva, José Emilio Campos, José F. Durigan, Wilson Pereira e Marisa G. Modernel, pelo companheirismo.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à bibliotecária Angelina Godoy, a Adelaide Costa, Eloisa H.D. Oliveira, Aracilda V. Moreira, Tânia Haddad e Claudia Adolfs, esta última pelo trabalho datilográfico.

## ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
SUMMARY	4
INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DA LITERATURA	10
- Fatores antinutricionais e toxicidade	11
- Composição e valor nutricional	37
- Alterações das propriedades originais do feijão com o tempo e condições de armazenamento	46
MATERIAL E MÉTODOS	51
- Material	51
- Métodos	53
Preparo das amostras no laboratório	53
Análises químicas e físicas	59
Análises bioquímicas	66
Ensaio biológico	69
Análise sensorial	75
RESULTADOS	80
- Estudo da composição e da toxicidade do feijão integral e das frações isoladas por extração e diálise	80
- Efeito do tratamento térmico sobre as propriedades nutricionais das proteínas do feijão e na eliminação de fatores tóxicos	90

	11
- Efeito das condições e tempo de estocagem sobre as propriedades físico-químicas, culinárias e nutricionais do feijão	105
- Efeito da adição de metionina ao feijão integral e às diversas frações	113
- Estudo da incorporação de metionina no feijão em grão pelo processo de maceração	120
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	135
CONCLUSÕES	148
BIBLIOGRAFIA	151

#### QUADROS E FIGURAS

##### Quadros

1. Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos	70
2. Composição centesimal da mistura salina usada nas dietas para os ensaios biológicos	71
3. Composição centesimal da mistura vitamínica utilizada nas dietas para os ensaios biológicos	72
4. Composição aproximada da farinha crua de feijão Rosinha G2 e de 6 materiais diferentes, resultantes do fracionamento da mesma (base seca)	82
5. Composição em aminoácidos da farinha crua de feijão Rosinha G2 e de 6 materiais resultantes do fracionamento da mesma farinha (g/16g N)	84

6. Atividade dos fatores antinutricionais da farinha crua do feijão Rosinha G2 e de 5 diferentes materiais obtidos pelo fracionamento dessa farinha 86
7. Toxidez biológica relativa da farinha crua de feijão Rosinha G2 e de diferentes materiais obtidos por fracionamento dessa farinha 89
8. Efeito do tratamento térmico sobre o valor nutricional das proteínas do feijão Rosinha G2 utilizado nas dietas como única fonte de proteínas 92
9. Efeito do tratamento térmico na disponibilidade de lisina da farinha de feijão Rosinha G2 e de 6 materiais obtidos por fracionamento da mesma 94
10. Efeito do tratamento térmico sobre o valor biológico (PER) e digestibilidade das frações protéicas isoladas do feijão Rosinha G2 comparado com a caseína 96
11. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade dos fatores antinutricionais no extrato aquoso de feijão Rosinha G2 101
12. Efeito do tempo e das condições de estocagem sobre as propriedades nutricionais das proteínas do feijão Rosinha G2 112
13. Efeito do tempo e da complementação com metionina sobre o valor biológico das proteínas do feijão Rosinha G2 115
14. Efeito da complementação com metionina sobre o valor nutricional das proteínas do feijão Rosinha G2 integral e das suas frações protéicas isoladas 118
15. Concentração de metionina em amostras de feijão Rosinha G2 antes e após enriquecimento por maceração 125

16. Avaliação nutricional das proteínas do feijão Rosinha G2 antes e após enriquecimento com metionina pelo processo de maceração 127
17. Disponibilidade biológica de metionina incorporada ao feijão Rosinha G2 por maceração 130
18. Preferência para feijão Rosinha G2 macerado em solução de metionina, usando-se o método Psicofísico de Comparação Pareada Direcional, dada em frequência (N=40) 133
19. Preferência para o odor e gosto do feijão Rosinha G2 macerado em solução de metionina e cozido com e sem tempero, usando-se o método de Escala Não-Estruturada 134

#### Figuras

1. Modelo de ficha usada no teste Psicofísico de Comparação Pareado Direcional para avaliação de preferência 78
2. Modelo de ficha usada no teste de Escala Não-Estruturada para avaliação de preferência 79
3. Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 8) do feijão Rosinha G2 submetido a diferentes tratamentos térmicos 93
4. Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 10) com a fração albumina do feijão Rosinha G2 autoclavada por tempos diferentes 97
5. Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 10) com a fração globulina do feijão Rosinha G2 autoclavada por tempos diferentes 98

6. Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 10) com o isolado total do feijão Rosinha G2 autoclavado por tempos diferentes 99
7. Inativação térmica do fator antitripsina, da hemaglutinina e perda de solubilidade das proteínas do feijão Rosinha G2 previamente macerado em água por 12 horas 103
8. Eletroforese em gel de poliacrilamida simples com extratos de feijão Rosinha G2 tratados termicamente em água fervente, por tempos diferentes 104
9. Variação da capacidade de absorção de água do feijão Rosinha G2 em função do tempo e condições de estocagem. Percentagem de hidratação no feijão macerado por 6 horas a temperatura ambiente 107
10. Variação de casca dura do feijão Rosinha G2 em função do tempo e condições de estocagem. Percentagem de casca impermeável após 6 horas de maceração em água a temperatura ambiente 108
11. Alteração da textura do feijão Rosinha G2 em função do tempo e condições de estocagem 109
12. Variação do tempo de cocção do feijão Rosinha G2 em função do tempo e condições de estocagem 110
13. Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 13) relativos ao tempo de estocagem e enriquecimento com metionina e cisteína do feijão Rosinha G2 116
14. Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 14) com farinha integral de feijão Rosinha G2 e suas frações proteicas autoclavadas e enriquecidas com metionina 119

15. Curva de retenção de metionina no feijão Rosinha G2 em função do tempo de maceração em solução a 3% de metionina e temperatura ambiente 122
16. Curva de retenção de metionina no feijão Rosinha G2 em função do tempo de maceração em solução a 5% de metionina e temperatura de 50°C 122
17. Curva de retenção de metionina no feijão Rosinha G2 em função da concentração de metionina durante 1 hora a 50°C 123
18. Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 16) no estudo com feijão Rosinha G2 enriquecido em solução de metionina 128

## RESUMO

Neste trabalho foram estudados parâmetros físico-químicos, fatores antinutricionais, fracionamento das proteínas, enriquecimento com metionina, efeito do tratamento térmico e das condições de estocagem nas características culinárias e nutricionais das proteínas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivado no Instituto Agronômico de Campinas.

A partir do feijão integral, que continha 26% de proteínas, foram preparadas seis frações: isolado protéico total, albuminas, globulinas, sólidos solúveis em água, insolúveis e material dialisável, contendo 82, 70, 90, 50, 15 e 20% de proteínas, respectivamente. A composição em aminoácidos, exceto do material dialisável, foi semelhante, apresentando teor baixo de metionina (média de 0,84g/16g N) e alto de lisina (média de 7,9g/16g N). O tratamento térmico reduziu a lisina disponível em todas as amostras, apresentando um decréscimo mais acentuado na farinha integral que, após uma hora a 121°C, passou de 6,0 a 3,5g/16g N.

Os fatores antinutricionais - os inibidores de tripsina e de quimotripsina e a hemaglutinina - foram detectados em todas as frações, com a albumina apresentando a maior atividade, ou seja, 376 e 115 unidades de tripsina e quimotripsina, respectivamente, inibidas por miligrama de proteína e hemaglutinação com 0,12µg de proteínas por mililitro. A resistência térmica desses fatores foi pequena - menos de 10 minutos em água fervente para o feijão inteiro. Entretanto, no extrato aquoso, exceto para a hema

glutinina, que deu reação negativa após 5 minutos, houve uma ativação que permaneceu acima de 100% por mais de 2 horas de fervura e, mesmo após uma hora de autoclavagem a 121°C, não houve inativação completa.

A digestibilidade *in vitro* das frações cruas foi baixa, cerca de 45%, porém quando o feijão foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, elevou-se a 79% para a fração globulina, 63% para a albumina e 66% para o isolado total. A digestibilidade no feijão integral foi de 61%. Para as frações isoladas e para o feijão integral a digestibilidade *in vivo* apresentou-se superior à *in vitro*.

Todas as amostras quando cruas, mesmo com adição de metionina ou extração com etanol a 70%, foram tóxicas, provocando 100% de letalidade nos ratos entre 3 e 23 dias. Entretanto, quando o feijão foi macerado por 12 horas e aquecido em água fervente por 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 5, 10, 15 e 30 minutos apresentou valores de PER 0,9, 1,0, 1,2, 1,0 e 0,7, respectivamente. Feijão integral, albuminas, globulinas e isolado total, autoclavados por 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos a 121°C, apresentaram valores de PER 0,60, 0,72, 0,59 e 0,68, respectivamente. Essas mesmas amostras, quando adicionadas de 3% de metionina em base protéica, tiveram seus valores de PER elevados para 2,5, 4,0, 4,3 e 4,4, respectivamente. Feijão estocado nas condições ambientais do laboratório por 18 meses resultou em decréscimo do PER de 1,3 para valor negativo, elevando-se a 2,5 com a adição de metionina.

O efeito das condições de estocagem sobre parâmetros

físico-químicos, culinários e nutricionais do feijão mostrou que quanto maiores o tempo, a temperatura e a umidade relativa, maiores foram os prejuízos. O feijão foi estocado por 6 meses em três condições: 12°C e 52% de umidade relativa (UR); ambiente (22-25°C) e 65-70% de UR e estufa a 37°C e 76% de UR, tendo este último apresentado a depreciação mais acentuada de suas características originais. Nessas condições o PER caiu de 1,0 para 0,1; a disponibilidade biológica da metionina de 46 para 28% e da cisteína de 52 para 30%; o tempo de cocção elevou-se de 60 para 240 minutos e a textura de 238 para mais de 500kg-força, pelo processo de extrusão no Instron.

O estudo da incorporação de metionina no feijão em grãos pelo processo de maceração, mostrou que a melhor condição foi aquela em que ele permaneceu por uma hora a 50°C em solução a 5% de metionina, elevando o conteúdo desta de 1,5 para 24g/16g N. O feijão tratado nessas condições e misturado com feijão testemunha, na proporção de 1:7, tinha valor para metionina de 3g/16g N. A análise sensorial dessa mistura não apresentou diferença estatística para preferência de odor e gosto em relação ao testemunha ( $p=0,05$ ). A avaliação nutricional dessa mistura mostrou que o PER do feijão testemunha elevou-se de 0,9 para 2,4 e 1,3, quando o mesmo foi cozido com e sem água de maceração, respectivamente. A absorção biológica da metionina incorporada ao feijão por maceração foi de 100%, enquanto que a da metionina contida originalmente no mesmo foi de apenas 55,8%.

## SUMMARY

Percent composition, toxicity, effect of heat-treatment on the inactivation of toxic components and on the improvement of nutritional value of the raw bean (*Phaseolus vulgaris*, L.), variety Rosinha G2 was studied. The above investigation was extended also to different fractions obtained from the integral flour, i.e., total protein isolate, albumin, globulin, total water soluble solids, water insoluble solids and the total dialysable solids. Influence of the storage conditions and addition of free methionine on the biological value of the bean proteins, as well as on the organoleptic and cooking properties of the bean kernels was also studied. The integral flour contained 26% protein (dry basis) and the above mentioned fractions 82, 70, 90, 50, 15 and 20%, respectively. The amino acid composition was similar in all materials being characterized by a low content of sulfur-containing amino acids 0.84g/16g N of methionine, and 0.54g/16g N of cysteine and a high content of lysine (7.9g/16g N). Heat-treatment reduced available lysine from 6.0 to 3.5g/16g N.

The activity of the antinutritional factors (trypsin, chymotrypsin inhibitors and phytohemagglutinin) was highest in the albumin fraction, where 376 units of trypsin and 115 units of chymotrypsin were inhibited per milligram of protein. Hemagglutination occurred with 0.12 $\mu$ g protein per milliliter.

Heat resistance of hemagglutinins was low (5-10min at 97°C). The trypsin and chymotrypsin inhibitors were easily inactivated in the whole bean (10min at 97°C) whereas in aqueous solution the heat resistance was very high; one hour at 121°C not being sufficient for their complete inactivation. The digestibility of the bean protein increased significantly with heat treatment particularly for the isolated protein fractions reaching values as high as 80%. In the integral flour the digestibility remained low (61%) even after heat-treatment. Short heat-treatment (5-10min, 121°C) improved the protein nutritive value, whereas treatment beyond 10min in an autoclave was detrimental to the nutritive value, even though these treatments were not sufficient to completely eliminate the activity of the known antinutritional factors. Unheated material killed all the experimental rats in a period ranging from three to twenty three days.

Storage of the beans under different conditions adversely affected the biological value of the proteins. The effect was greater as the storage temperature and humidity increased. The conditions used were: 12°C and 52% R.H., 22-25°C and 65-70% R.H. and 37°C at 76% R.H. during six months. At 37°C and 76% R.H., the PER value dropped from 1.0 to 0.1 while the available methionine decreased from 46 to 28% and available cysteine from 52 to 30%. For the same sample the cooking time increased from 60 to 240min and the texture, extrusion in the Instron, from 238 to over 500kg-force. Percentage of hard

shell kernels increased only for the sample stored at environmental conditions of the laboratory (22-25°C and 65-70% H.R.). Incorporation of methionine (3% of the protein) raised the PER of the bean to the level of 2.5 even in beans that were previously stored for six months. Addition of methionine to the isolated protein fractions had still a much greater effect raising the PER values from 0.72, 0.59 and 0.68 to 4.0, 4.3, and 4.4 for the albumin, globulin and total protein isolate, respectively.

A set of conditions was established to introduce methionine to the whole bean by infusion. The best approach was to soak the bean in a 5% methionine solution (1:2 ratio) at 50°C for 1 hour. By this procedure the methionine content of the bean was increased from 1.5 to 24g methionine per 100g bean protein. The infused beans when mixed with the non-infused ones at a 1:7 ratio gave a product with approximately 3g methionine per 100g bean protein with a PER of 2.4.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Phaseolus* e, mais precisamente, a espécie *Phaseolus vulgaris*, onde estão botanicamente classificados os feijões comuns, tem contribuído largamente com a Agricultura do Velho e Novo Mundo. Dados obtidos através da medida do carbono radiativo mostraram que essa espécie foi adaptada às condições de cultivo na América Central há cerca de 7.000 anos, situando-se entre as mais velhas culturas conhecidas. Foi introduzido na Europa no século XVI e desde então tornou-se importante cultura para grande parte do mundo.

Atualmente, o feijão comum constitui importante fonte protéica na dieta de enorme parcela da população mundial, particularmente naqueles países em que o consumo de proteína animal é limitado por razões econômicas, por falta ou por imposição religiosa e cultural. Dentro desse contexto estão indianos, africanos e latino-americanos, sendo que no Brasil é praticamente a única semente leguminosa fornecedora de proteínas diretamente na alimentação, fazendo parte da dieta diária, principalmente das classes sócio-econômicas menos favorecidas.

Muito pouco se conhece sobre as propriedades nutricionais, composição, características tecnológicas, sensoriais e mesmo no campo da genética dos feijões brasileiros, principalmente tendo-se em conta o grande número de variedades e linhagens experimentais existentes.

Infelizmente, a contribuição nutricional do feijão deixa muito a desejar, uma vez que suas proteínas apresentam baixa digestibilidade, inadequado balanço de seus aminoácidos essenciais, principalmente dos sulfurados que são os limitantes, apresentando ainda substâncias tóxicas e antinutricionais, especialmente quando no estado cru ou mal processado. Mesmo assim, na dieta brasileira não é fácil substituir o feijão. O grão-de-bico e a lentilha, com mais ou menos o mesmo valor nutritivo do feijão, não são bem aceitos, enquanto que a soja, que é mais nutritiva, simplesmente não é utilizada como alimento humano no Brasil, salvo em raras exceções. O feijão possui alto teor de lisina, que é o aminoácido essencial limitante do arroz. Isso implica em que as proteínas de ambos se complementam, fazendo com que o tradicional "feijão com arroz" represente uma fonte de proteína vegetal de boa qualidade.

É interessante notar que, apesar de as proteínas das leguminosas, mais especificamente dos feijões comuns, terem assumido tão grande importância na dieta humana, contêm uma larga variedade de substâncias que podem ser consideradas tóxicas para o organismo humano e animal. Tais substâncias, geralmente mencionadas como agentes antinutricionais, são na sua maioria de natureza protéica e termolábeis, embora algumas pareçam ser resistentes à ação do calor, interferindo negativamente no valor biológico das proteínas, mesmo após o cozimento do feijão.

Muitos estudos para inativar esses agentes e, conseqüentemente, aumentar as qualidades e o valor biológico dos grãos têm sido levados a efeito por vários pesquisadores. Alguns desses fatores antinutricionais já foram isolados e estudados com bastante detalhes, enquanto que a natureza química e as propriedades de outros ainda não são bem conhecidos. De maneira geral, esses fatores são termolábeis, ficando inativados pelo calor e, mais rapidamente, pelo calor úmido. Todavia, tanto os agentes prejudiciais como os nutrientes valiosos são destruídos pelo calor e, dessa maneira, mesmo o tratamento térmico ideal para a inativação dos agentes prejudiciais implica em solução de compromisso.

O ótimo procedimento no cozimento ou outro processo para inativar os inibidores de proteases, as hemaglutininas e outras substâncias tóxicas termossensíveis é provável que não seja o mesmo para todas as espécies e variedades de leguminosas, porque elas contêm concentrações diferentes desses compostos.

Os principais objetivos deste trabalho foram: 1) estudar a toxidez de diferentes frações protéicas do feijão; 2) estudar os efeitos do tratamento térmico sobre o valor biológico das proteínas no feijão integral e nas diferentes frações protéicas isoladas; 3) estudar o efeito do enriquecimento do feijão em grão e das frações protéicas isoladas com metionina; 4) estudar as variações do valor biológico das proteínas do feijão em função do tempo e das condições de estocagem.

## REVISÃO DA LITERATURA

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, é uma leguminosa de alto teor protéico, cuja classificação botânica, de acordo com Burkard, 1952, é:

Divisão	<i>Fanerogamae</i>
Sub-divisão	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Ordem	<i>Rosales</i>
Família	<i>Leguminosae</i>
Sub-família	<i>Papilionoideae</i>
Tribo	<i>Phaseoleae</i>
Gênero	<i>Phaseolus</i>
Espécie	<i>Phaseolus vulgaris</i>

Kaplan, 1965, baseado em trabalhos arqueológicos, sugere o feijão como originário das Américas, especialmente do sul dos Estados Unidos, México, demais países da América Central e norte da América do Sul, principalmente das regiões da antiga cultura incaica. Baseado em estudos com carbono radioativo, foi possível verificar que no México o *Phaseolus vulgaris* foi adaptado às condições de cultivo há cerca de 7.000 anos. Após a descoberta das Américas o feijão foi levado para o Velho Mundo, onde se tornou importante cultura, a ponto de

alguns cientistas, como De Condolle, 1915, afirmarem ser o mesmo originário daquele continente.

Atendendo às necessidades inerentes ao desenvolvimento do trabalho, nesta revisão bibliográfica serão enfatizadas as características físico-químicas, toxicológicas, culinárias e nutricionais do feijão e suas frações protéicas, destacando-se fatores antinutricionais e toxicidade, composição e valor nutricional e alteração das propriedades originais do feijão comum com o tempo e condições de armazenamento.

#### Fatores antinutricionais e toxicidade

Como leguminosa, o feijão comum apresenta, essencialmente, os mesmos fatores antinutricionais que a soja, apenas com toxidez biológica comprovadamente mais elevada.

Devido à grande importância que assumiu a soja no campo da nutrição animal e humana, quase que a totalidade dos trabalhos realizados sobre os fatores antinutricionais das leguminosas referem-se à soja. Em relação a outras leguminosas, como por exemplo à espécie *Phaseolus vulgaris*, os trabalhos são mais recentes, sendo que o acervo de conhecimentos básicos para tais pesquisas é encontrado nos trabalhos com a soja, uma vez que as características bioquímicas dos fatores antinutricionais são semelhantes. Baseado nisso, fica caracterizada a necessidade, para melhor entendimento do estudo dos agentes antinutricionais do feijão, de se fazer referências àqueles

trabalhos com soja que foram os marcos do conhecimento de tais fatores, a partir dos quais tiveram seqüência os trabalhos com o feijão. Entre os fatores antinutricionais que se tem conhecimento no feijão, destacamos: fator antitripsina, fito-hemaglutininas, agentes bociígenos e fatores de flatulência. Ainda há outros fatores menos conhecidos, mas devido à natureza deste trabalho, não serão aqui tratados.

#### Fator antitripsina

O inibidor da tripsina é certamente o mais conhecido e estudado entre os fatores antinutricionais existentes nas leguminosas. É assim chamado por causa de sua capacidade de inibir a ação da enzima digestiva tripsina, encontrada no trato intestinal do homem e dos animais.

Segundo Laskowski e Laskowski, 1954, uma retrospectiva da evolução do estudo da antitripsina leva a um passado bem remoto. Numerosas observações sugerindo a presença de substâncias capazes de inibir a tripsina foram feitas desde fins do século passado. Essas substâncias foram encontradas na clara do ovo, no suco pancreático, no sangue, na urina e em muitas plantas.

O clássico experimento de Osborne e Mendel, 1917, demonstrando a superioridade nutricional da soja aquecida sobre a mesma quando crua, deu início a numerosos trabalhos na investigação do fenômeno de repressão do crescimento de animais

alimentados com soja, *Glycine max*, e outras leguminosas, principalmente do gênero *Phaseolus*.

Johns e Finks, 1920, observaram que o feijão comum "Navy bean" (*Phaseolus vulgaris*) e outras leguminosas constituíam uma fonte de proteínas de má qualidade para ratos e que, quando tratado termicamente, sofria uma acentuada melhoria no seu valor nutricional. Esses achados foram confirmados por numerosos investigadores, que sempre concluíram pelo efeito favorável do tratamento térmico sobre o valor nutricional das proteínas das leguminosas, quando administradas a ratos, pintos e outras espécies monogástricas. Embora a causa real não fosse conhecida, tais pesquisadores acreditavam ser a baixa digestibilidade que as proteínas apresentavam quando no estado nativo a principal responsável pelo baixo valor biológico.

Os estudos subseqüentes continuaram mostrando que a repressão do crescimento de animais alimentados com soja e outras leguminosas era acompanhada de vários distúrbios fisiológicos, embora a extensão com que cada fator contribuía para o efeito negativo total continuasse, como ainda continua, obscura.

A abordagem mais científica sobre o problema dos inibidores da tripsina, bem como o seu possível efeito negativo para o valor nutricional das proteínas, teve início em 1931, com o trabalho de Northrop e Kunitz, que cristalizaram a tripsina do pâncreas bovino.

Entretanto, somente em 1944 a presença de inibidor da tripsina em soja e feijão "Navy bean" foi detectada, independentemente, por Bowman e por Han e Sandstedt. Essa descoberta foi o resultado da observação de que no extrato obtido da soja não tratada termicamente havia uma substância que *in vitro* inibia a ação da tripsina sobre a caseína. Tal substância apresentava efeito retardatório sobre o crescimento de ratos, entretanto tornava-se inativa quando o extrato era autoclavado, ou então preparado com soja previamente submetida ao calor.

Os estudos subseqüentes tiveram a seguinte abordagem: 1) isolamento e cristalização do inibidor da tripsina da soja, o que foi feito por Kunitz, em 1945 e 1946, que também estudou a caracterização parcial de suas propriedades, em 1947; 2) descobrimento do inibidor da tripsina em várias espécies de leguminosas, sendo tal contribuição devida principalmente a Borchers e col., 1947, Borchers e Ackson, 1950; 3) purificação de outros fatores tóxicos de leguminosas, substâncias essas que eram adversas ao crescimento de animais jovens, mas que eram livres de atividade antitriptica, o que foi devido principalmente a Liener e Pallansch, em 1952, e Liener, em 1953.

Kunitz, 1945 e 1946, foi quem pela primeira vez cristalizou e isolou da soja um produto com forte atividade inibitória da tripsina. Mais tarde, o próprio Kunitz, 1947, estu-

dou suas propriedades, mostrando sua forte afinidade pela tripsina e menor afinidade pela quimotripsina. A esse produto foi dado o nome de "inibidor da tripsina" ou "fator antitripsina" que é uma proteína com propriedades de uma  $\alpha$ -globulina, precipitável com ácido tricloracético (TCA), não dialisável, peso molecular ao redor de 24.000, com um espectro máximo de absorção a 280 nanômetros, ponto isoelétrico a pH 4,5 e termolábil. Sua ação inibitória evidencia-se apenas no estado nativo, sendo que o calor, ácido ou álcali, destrói seu poder inibidor. Experimentos *in vitro* com esse inibidor cristalino têm mostrado, mesmo em alta diluição, uma reação estequiométrica praticamente instantânea e irreversível entre a enzima tripsina e o inibidor, formando um composto estável que não se dissocia, exceto em meio fortemente ácido.

O inibidor da tripsina encontrado na soja, quando purificado, reage com igual peso de tripsina pura e sua atividade é detectada pelo decréscimo da atividade da tripsina na digestão da caseína.

De Muelenaere, 1965, estudou o efeito da toxidez do inibidor de tripsina extraído da soja quando aplicado por via intraperitonal, tendo observado que injeções do inibidor cristalizado cinco vezes não produziu efeitos tóxicos em ratos, enquanto que o preparado cru produziu efeitos tóxicos. O princípio tóxico parece ser extraído juntamente com o inibidor da tripsina e eliminado durante os primeiros estágios da

purificação.

O feijão americano "Navy bean" (*P. vulgaris*) foi um dos feijões em que Bowman, 1944, originalmente descobriu o inibidor da tripsina, embora a primeira investigação sistemática com outras leguminosas, entre elas os feijões "Garden bean" (*P. vulgaris*) e "Lima bean" (*P. lunatus*), como fontes de inibidor da tripsina tenha sido feita por Borchers e col., 1947. O inibidor da tripsina encontrado no feijão "Lima bean", em contraste com o da soja, foi extremamente termorresistente.

Recentemente, várias frações protéicas com atividade inibitória da tripsina foram parcialmente purificadas. Kade e Evans, 1965a, usando farinha de feijão "Navy bean", isolaram cinco frações, todas com atividade inibitória do crescimento de ratos, o que pode ser atribuído ao inibidor da tripsina e mesmo ao fator tóxico hemaglutinina. Mesmo assim, não há até o momento publicação sobre o isolamento do inibidor de tripsina do feijão "Navy bean" em estado quimicamente puro.

Mesmo tendo sido encontrada alta atividade inibitória da tripsina em várias outras variedades de *Phaseolus vulgaris* e observado que a autoclavagem melhora o valor nutricional, poucas são as publicações detalhadas a respeito da natureza química do inibidor dessas leguminosas. Dentre os trabalhos dessa natureza, cabe destacar Wagner e Riehm, 1967, que purificaram e caracterizaram parcialmente o inibidor da trip-

sina do feijão "Navy bean". O peso molecular encontrado por ultracentrifugação foi de 23.000, peso esse quase igual ao do inibidor de tripsina encontrado na soja - 24.000 - descrito por Kunitz, 1947. Esse inibidor demonstrou possuir dois mols de hexose por mol de proteína e as determinações de aminoácidos indicaram ser rico em 1/2-cistina (30 resíduos/mol), pobre em metionina (um resíduo/mol) e não possuir triptofânio.

Ainda com respeito à natureza química do inibidor de tripsina das variedades de *Phaseolus vulgaris*, cabe destacar os trabalhos de Stead e col., 1966, e de Pusztai, 1966. Esses autores, usando eletroforese e/ou centrifugação, isolaram dos feijões americanos "Natal bean" e "Kidney bean", ambos *Phaseolus vulgaris*, um homogeneizado com forte atividade inibitória da tripsina e que formou um complexo estequiométrico com essa enzima.

Liener, 1976, fazendo uma ampla revisão dos agentes tóxicos em leguminosas, referiu que os estudos presentes revelam que somente cerca de 40% da inibição do crescimento e da hipertrofia do pâncreas de animais alimentados com leguminosas cruas pode ser atribuída ao inibidor da tripsina. O restante da inibição do crescimento foi atribuído à baixa digestibilidade e outros fatores tóxicos, entre os quais as fitohemaglutininas.

Numerosos pesquisadores reconhecem que um processo adequado de aquecimento aumenta as qualidades nutricionais

das leguminosas, entretanto, para Ambrose, 1966, a inativação ou destruição do inibidor da tripsina pelo cozimento ou autoclavagem nem sempre aumenta o valor nutricional, possivelmente devido ao desequilíbrio dos aminoácidos ou à presença de outros princípios tóxicos.

Mesmo com todos os conhecimentos acumulados até o presente, ainda não se sabe com certeza a importância dos inibidores de proteases na depreciação nutricional das leguminosas para os animais e, principalmente, para humanos, bem como as suas funções fisiológicas na planta, uma vez que não inibem a atividade proteolítica das sementes onde se encontram.

#### Fito-hemaglutininas

Assim chamadas por sua capacidade de promover aglutinação *in vitro* dos glóbulos vermelhos de sangue humano e de várias espécies animais. Trata-se de glicoproteínas largamente distribuídas no reino vegetal, principalmente entre a família das leguminosas.

Conforme citação de vários pesquisadores, desde o início do século, sabe-se que em sementes de leguminosas, especialmente de feijões, existem substâncias capazes de promover a coagulação do sangue, bem como de aglutinar eritrócitos lavados. A hemaglutinação não mais ocorre após tratamento térmico das sementes ou do extrato preparado com esses materiais.

Sharon e Lis, 1972, mencionam que os conhecimentos

sobre as hemaglutininas datam desde fins do século passado, tendo sido Stillmark, 1888, o primeiro a descrever o fenômeno da aglutinação por extratos de plantas. Inicialmente, Stillmark encontrou uma proteína altamente tóxica nos grãos de mamona (*Ricinus communis*), à qual denominou "ricin", capaz de aglutinar glóbulos vermelhos do sangue humano e animal. A seguir, esse pesquisador descobriu uma proteína igualmente tóxica no feijão jequiriti (*Abrus precatorius*), à qual denominou "abrin".

A existência de fito-hemaglutininas no feijão "Kidney bean" é conhecida desde 1908, quando foi observada pela primeira vez por Landsteiner e Kaubitschek. Esses autores não só verificaram a atividade hemaglutinante nos extratos de diferentes leguminosas, mas também apontaram o fato de que muitos desses extratos atuavam sobre glóbulos vermelhos somente de algumas espécies animais. Extratos de feijão "Kidney bean" foram ativos com todas as amostras de sangue testadas. Mendel, 1909, Schneider, 1911, Goddard e Mendel, 1929, também reconheceram tais substâncias nas leguminosas.

Desde o início dos estudos até o presente, muitos termos têm sido usados para designar essas glicoproteínas largamente distribuídas entre as plantas, especialmente entre as leguminosas, a saber: ricina, abrina, soína, hemaglutinina, fito-hemaglutinina, fito-aglutinina e lectinas. Evidenciando esse fato, cabe lembrar que Smith e Circle, 1972, citaram que Lanfer

e col., 1944, propuseram para essa proteína aglutinadora isolada da soja o nome de "soyin" e para a mesma proteína, Liener, 1953, propôs o nome de "hemaglutinina da soja". Por outro lado, Sharon e Lis, 1972, referem-se a ela como fito-hemaglutininas ou fito-aglutininas. Entretanto, o termo "lectinas" (do latim *legere* = eleger), proposto por Boyd e Shapleigh, 1954, parece ser mais adequado, uma vez que essas proteínas ocorrem em outros organismos, além das plantas. Mais recentemente, Andrews e Jayme-Williams, 1974, referem-se a essas proteínas, especialmente às de feijões, como fito-hemaglutininas; Andrews, 1974, como lectinas e Jaffé e col., 1974, como fito-hemaglutininas, ou lectinas.

Não há muitos trabalhos relacionados com as características físico-químicas das hemaglutininas, entretanto, sendo a da soja muito estudada, cabe aqui mencionar algumas propriedades conhecidas e que serviram de base para as pesquisas dessas substâncias aglutinadoras nos feijões. Inicialmente, devemos mencionar Liener, 1955, que desenvolveu um método fotométrico para determinação quantitativa da atividade hemaglutinante da hemaglutinina da soja. Esse método baseia-se no fato de que os eritrócitos de coelhos sedimentam proporcionalmente com a concentração da hemaglutinina presente.

A presença de múltiplas formas de hemaglutininas na soja tem sido referida por vários pesquisadores, entre os quais Lis e col., 1966, que mostraram que a soja contém qua-

tro diferentes hemaglutininas, separáveis por cromatografia em DEAE-celulose, denominadas HG-I, HG-II, HG-III e HG-IV. Todas as quatro parecem ser glicoproteínas, contendo 4,5% de manose e 1% de glicosamina, com peso molecular 110.000.

Catsimpoilas e Meyer, 1969, isolaram da soja quatro diferentes proteínas por focalização isoelétrica na faixa de 5 a 8, denominando-as de A, B, C e D, com pontos isoelétricos de 5,85, 6,00, 6,10 e 6,20, respectivamente e imuniquimicamente idênticas. A fração mais abundante foi a B, sendo similar à fração HG-I descrita por Lis e col., 1966.

Das variedades de *Phaseolus vulgaris*, Andrews, 1974, isolou e caracterizou no estado altamente purificado dois componentes de um extrato aglutinante de feijão "Navy bean". Um deles, uma lectina, promovia forte aglutinação de eritrócitos e leucócitos de cavalos, facilmente observada com os dois tipos de células em concentração de apenas quatro microgramas de lectina por mililitro. O outro composto (Componente 1), possuía pouca ou quase nenhuma atividade aglutinante e apresentava peso molecular de 143.000, tendo uma estrutura tetramérica, com peso molecular unitário ao redor de 37.000 e alanina como aminoácido N-terminal. O componente lectina apresentou menor peso molecular - 114.000 - e o aminoácido arginina no terminal amínico da cadeia. Os dois constituintes eram glicoproteínas e a composição em carboidratos representou 4,9% para o Componente 1 e 8,1% para o componente lectina, sendo constituí

dos de manose, glicosamina, pouca glicose e traços de xilose e arabinose.

Numerosos trabalhos são encontrados na literatura antiga, descrevendo os efeitos tóxicos produzidos em animais, pela ingestão de algumas leguminosas. Assim, Osborne e Mendel, 1912, observaram que ratos não cresciam quando a fonte proteica da dieta era derivada do feijão "Kidney bean" e que a ingestão prolongada resultava em morte dos animais. A partir dessa observação, numerosos pesquisadores, como McCollum e col., 1917, Johns e Finks, 1920, Everson e Heckert, 1944, Jaffé, 1950a-b, etc., fizeram observações similares para um grande número de variedades de feijões que são botanicamente classificados como *Phaseolus vulgaris*.

Mesmo sendo conhecida há muito tempo, somente na década de 1950 foram iniciados os estudos para elucidar a toxidez das fito-hemaglutininas na alimentação animal. Muitos cientistas trabalharam e continuam pesquisando para esclarecer até que ponto a toxidez desses compostos é prejudicial na alimentação. Entretanto, as conclusões ainda não são definitivamente coerentes e, às vezes, são até contraditórias. Entre os cientistas mencionados, merecem destaque Liener e Pallansch, 1952, que foram os primeiros a isolar e purificar uma substância tóxica da soja, mostrando características de forte inibição do crescimento quando injetada via intraperitonal e capaz de matar os animais se sua proporção, em relação à dieta,

excedesse a 1%. Essa substância era virtualmente livre de atividade antitriptica e se caracterizava por marcada atividade aglutinante *in vitro* dos glóbulos vermelhos do sangue de várias espécies de animais. Liener, 1953, estudou o efeito retardatório do crescimento de ratos e a toxidez das hemaglutininas. Segundo ele, a toxidez da hemaglutinina da soja era semelhante a de outras plantas. A dose letal para 50% dos ratos em crescimento (LD<sub>50</sub>) era cerca de 50mg/kg de peso vivo de animal quando administrado via intraperitonial, mas não tinha ação letal quando administrado via estomacal até o nível de 500mg/kg de peso vivo. O mesmo autor observou ainda ser a hemaglutinina responsável por mais ou menos 50% da inibição do crescimento dos ratos alimentados com soja crua.

Liener, 1962, revisando os estudos até então realizados a respeito dos agentes tóxicos das leguminosas, discutiu o fato de que o efeito, benéfico ou não, do calor sobre o valor nutritivo das leguminosas e a presença ou não de inibidor da tripsina não revelam uma relação totalmente óbvia entre si, conclusão que foi reportada por Borchers e Ackerson, 1950, e também por Jaffé, 1950a. Essas observações discrepantes chamaram a atenção para a possível presença de outros inibidores do crescimento dos animais nas leguminosas cruas que seriam destruídos pelo calor. Isso parece ter sido a razão para os estudos de Liener e Pallansch, 1952, Liener, 1953, e de outros pesquisadores no que se refere a toxidez das hemaglutini

nas na alimentação.

Reforçando as observações até então evidenciadas, Rigas e Osgood, 1955, Jaffé e Gaede, 1959, e Honavar e col., 1962, usando preparações purificadas de hemaglutinina de feijão comum, mostraram um efeito marcadamente inibitório do crescimento de ratos. Jaffé, 1968, sugeriu que a ação da hemaglutinina deve ser a de combinar-se com as células da parede intestinal e assim interferir com a absorção dos nutrientes.

Honavar e col., 1962, observaram que os feijões pretos eram muito tóxicos no estado cru, causando a morte de todos os ratos no período de uma semana. Quando autoclavados a 121°C por 30 minutos, esses feijões promoviam um crescimento lento e, em alguns casos, perda de peso nos ratos. Esses autores observaram também que outras espécies de leguminosas (*Phaseolus aureus*, *Cajanus cajan* e *Cicer arietinum*), que não apresentavam atividade hemaglutinante, não causaram morte dos animais com a administração de proteína crua na dieta, apresentando um ganho de peso idêntico tanto para a dieta crua, como para a autoclavada após maceração. No mesmo estudo, ainda foi observado que uma fração purificada contendo hemaglutinina e incorporada na dieta com 10% de caseína inibiu o crescimento dos ratos, menos severamente a do feijão "Black bean" do que a do feijão "Kidney bean". O aumento do nível de hemaglutinina na dieta até 1,5% para o "Kidney bean" causou a morte dos animais no período de uma semana, enquanto que para o

feijão "Black bean" foi necessário aumentar esse nível para 4,6% para se obter o mesmo efeito. Quando a hemaglutinina adicionada na dieta foi aquecida em solução aquosa até a fervura por 30 minutos, não exerceu efeito negativo no crescimento dos ratos, mesmo a níveis superiores àqueles que foram letais no caso da proteína não aquecida. Importante também foi o fato de que os feijões macerados antes da autoclavagem promoveram um crescimento normal nos ratos, observação essa que está de acordo com Jaffé, 1949b, e que denuncia que na água de maceração drenada saem elementos de baixo peso molecular, responsáveis por toxidez mesmo após o cozimento, bem como pelo gosto desagradável no produto, além de evidenciar que o calor úmido deve ser mais eficiente na destruição dos agentes tóxicos.

De Muelenaere, 1965, constatou que a atividade hemaglutinante em algumas espécies de *Phaseolus vulgaris* variou de 155.000 unidades de hemaglutinina por grama (U.H./g) para o feijão "Natal Round Yellow" até 3.200 U.H./g para o feijão "Butter bean". A autoclavagem desses feijões resultou, sem exceção, em redução dessa atividade hemaglutinante até valores desprezíveis. De seu estudo ficou evidenciado que, enquanto a toxidez intraperitonal só existiu nas leguminosas com atividade hemaglutinante acima de 1.000 U.H./g, a hemaglutinação não foi necessariamente o fator responsável. O feijão "Jack Sword" (*Canavalia ensiformis*) foi altamente tóxico, embora sua atividade de hemaglutinação fosse de apenas 1.200 U.H./g, ao

passo que o feijão "Haricot bean" (*Phaseolus vulgaris*), com 40.000 U.H./g, não foi tóxico.

Jaffé, 1968, discutindo as propriedades das hemaglutininas das leguminosas, afirma que umas são mais tóxicas do que as outras, dependendo da procedência e especificidade frente a diferentes tipos de sangue. Diz ainda que a toxidez das leguminosas cruas é devida, provavelmente, à ação combinada de vários fatores, o que ficou demonstrado por De Muelenaere, 1965, acima referido. Ainda em 1968, Jaffé e Lette verificaram que extratos de feijão "Kidney bean" eram ativos quanto à aglutinação de glóbulos de sangue de coelhos e tóxicos quando adicionados na dieta de ratos em crescimento. Dietas preparadas com esse feijão e suplementadas com metionina causavam perda de peso e morte dos ratos, mesmo com ou sem adição de 10% de caseína previamente digerida por ácido ou enzimaticamente. Foi observada a atividade aglutinante nas fezes dos ratos alimentados com dietas contendo feijão cru. A atividade antitriptica, bem como antiamilásica, foi alta em alguns feijões e ausente em outros, não apresentando, entretanto, relação direta com a inibição do crescimento. O baixo crescimento promovido por feijões livres de hemaglutininas pode ser explicado pela baixa digestibilidade e a presença de substâncias inibidoras do aproveitamento das proteínas, diferentes dos inibidores de proteases e de amilases.

Jaffé e Brucher, 1972, e Jaffé e col., 1972, usando

glóbulos vermelhos de diferentes animais, distinguiram quatro tipos de atividade hemaglutinante nos extratos de diferentes variedades de feijão: 1) aqueles que aglutinam eritrócitos de coelhos e eritrócitos tripsinizados de bovinos, denominados de tipo A; 2) aqueles que aglutinam somente eritrócitos de coelhos, denominados de tipo B; 3) os que aglutinam somente eritrócitos tripsinizados de bovinos, denominados de tipo C; 4) os que não atuam sobre nenhum dos dois eritrócitos, denominados de tipo D. Esses quatro podem ser detectados com sangue de hamster tratado com pronase. Os extratos dos tipos A e C foram tóxicos ao serem injetados em ratos. Os mesmos autores também observaram que, ao serem aquecidos tais extratos, a atividade hemaglutinante sobre os eritrócitos de coelhos desapareceu mais rapidamente do que sobre os tripsinizados de bovinos e que a ação tóxica ainda permaneceu após duas horas de aquecimento a 85°C. Os testes mostraram que ratos alimentados com feijões contendo hemaglutininas dos tipos A e C perderam peso e morreram, enquanto que aqueles que receberam dietas com os tipos B e D não apresentaram sinal de intoxicação. Nas fezes de todos os ratos foi encontrada hemeaglutinina, o que os levou a concluir que a diferença na toxidez não foi devida a uma diferença da resistência à digestão.

Pusztai e col., 1975, isolaram e caracterizaram parcialmente alguns constituintes tóxicos do feijão "Kidney bean". A extensão da toxidez das frações de feijão foi avaliada pela perda de peso de ratos em crescimento, alimentados com uma

dieta com 5% de caseína e 5% de proteína do feijão ou em quantidades proporcionais das frações albumina e globulina dos feijões. Ambas as frações protéicas, albumina (6,3% do total) e globulina (11% do total), foram tóxicas. Os compostos de baixo peso molecular apresentaram pouca diminuição no crescimento dos ratos. O fracionamento por eletroforese de alta voltagem indicou que a maior toxidez da fração albumina pode ser devida à presença de uma isolectina. Outra similar, mas não idêntica, poderia ser também a responsável pela toxidez da fração globulina. Esses resultados também demonstraram que as três proteínas - glicoproteínas I e II e o inibidor de tripsina, que juntas perfazem  $3/4$  do total das proteínas - contribuem muito pouco para a toxidez do feijão "Kidney bean".

Pusztai e Palmer, 1977, purificaram por cromatografia de afinidade as lectinas de feijão "Kidney bean". O NPU (Net Protein Utilization) em ratos alimentados com dieta contendo 5% de caseína foi enormemente depreciado por essa preparação de lectina purificada. Por outro lado, dietas preparadas com proteínas de feijão "Kidney bean", livres de lectinas, não foram tóxicas para os ratos, de onde se pode sugerir que o princípio tóxico está relacionado com as lectinas do feijão.

A despeito da toxidez que o feijão possa encerrar, Jaffé e col., 1972 e 1974, evidenciaram que o recente interesse pelo estudo de suas fito-hemglutininas é devido à sua capacidade de estimularem culturas de tecidos linfáticos a desen-

volver mitose. Isso tem proporcionado uma excelente ferramenta para o estudo de uma larga variedade de fenômenos biológicos relacionados com esses problemas. Esses autores, usando os quatro tipos específicos de fito-hemaglutininas, A, B, C e D, identificados por Jaffé e col., 1972, e Jaffé e Brucher, 1972, verificaram que: 1) em todas as culturas de linfócitos, às quais foram adicionados os extratos de feijão dos tipos A e C, houve 30 a 40% de transformações alongadas e 4 a 5% de células com mitose; 2) nas culturas adicionadas dos tipos B e D não houve mais do que 3% de células alongadas, não ocorrendo mitogênese; 3) extratos desses quatro tipos de cultivares, purificados em Biogel P-100 e submetidos a cromatografia em DEAE-celulose, originaram dois picos, um eluído em pH 7,9 (fração  $\alpha$ ) e outro em pH 5,9 (fração  $\beta$ ); 4) o peso molecular, determinado por filtração em gel, foi maior para a fração  $\alpha$  do que para a  $\beta$ , isto é, 125.000 e 85.000, respectivamente, diferenciando as duas também em relação à composição em açúcares; 5) em todos os casos, a fração  $\alpha$  apresentou maior atividade hemaglutinante do que a  $\beta$ , sendo que a especificidade continuou a mesma desde o extrato cru para as ambas frações  $\alpha$  e  $\beta$ ; 6) as frações  $\alpha$  e  $\beta$ , isoladas dos feijões dos tipos B e D, tiveram uma ação mitogênica mínima, ao passo que as de A e C foram mitogênicas, sendo essa ação sempre maior em  $\alpha$  do que em  $\beta$ ; 7) os tipos mais mitogênicos foram também os mais tóxicos.

Em trabalho anterior ao de Jaffé e col., 1972, aci-

ma referido, Rivera e Mueller, 1966, observaram que as fito-hemaglutininas de *Phaseolus vulgaris* podem estimular o crescimento e mitose de linfócitos, conforme já havia sido observado por outros pesquisadores. Elas aglutinam leucócitos, bem como glóbulos vermelhos, sendo que a atividade mitogênica decresce quando as leuco-aglutininas são removidas por absorção. Esse trabalho evidencia, pelo menos, três atividades distintas das fito-hemaglutininas que afetam os linfócitos: 1) uma leuco-aglutinina; 2) um fator que induz à replicação do DNA (fator mitogênico) e 3) um fator que induz à síntese do RNA. Nenhum desses três fatores foi isolado na forma purificada, tendo sido suas atividades heterogêneas em relação à distribuição das proteínas durante o fracionamento. As observações desse trabalho levam a crer que os princípios ativos estão em várias proteínas similares com um peso molecular ao redor de 100.000. Engajados nessa linha de pesquisa, Brucher e col., 1969, detectaram atividade de fito-hemaglutininas em extratos de algumas variedades de feijões silvestres, com especificidade semelhante à dos feijões comuns e induzindo a mitose em linfócitos humanos.

Nos estudos referentes às hemaglutininas das leguminosas, a maioria dos pesquisadores evidencia que sua atividade é rapidamente destruída pelo calor úmido.

Em trabalhos de revisão, Sharon e Lis, 1972, e Liener, 1966 e 1976, relatam que, embora grande progresso te-

nha sido feito no estudo das lectinas, um grande número de questões a respeito de suas propriedades, usos e funções permanece sem respostas. Seu significado nutricional está ainda longe de ser perfeitamente entendido. Embora as propriedades físico-químicas e biológicas do fator antitripsina e hemaglutinina sejam diferentes, baseando-se no estudo do isolamento e purificação, essas substâncias mostram um efeito comum: o de diminuir o crescimento de animais jovens, mostrando que são capazes de influenciar na digestão e na utilização metabólica dos nutrientes. Acredita-se que, nesse caso, as fito-hemaglutininas exercem um efeito não-seletivo adverso na absorção de nutrientes ao nível intestinal, refletindo indiretamente sobre a digestibilidade das proteínas. A coexistência dessas e de outras substâncias, todas com o mesmo efeito, mesmo com ações biológicas diferentes, sugere que o mecanismo do retardamento do crescimento deve ser uma interação bem complexa. Parece claro que a inibição do crescimento deve ser resultado da ação combinada de um certo número de efeitos individuais. Realmente, os conhecimentos acumulados durante as últimas décadas, especialmente aqueles mais recentes, têm demonstrado que as fito-hemaglutininas, particularmente as encontradas em plantas do gênero *Phaseolus vulgaris*, representam importante fator negativo no valor nutricional dessas leguminosas.

De todos os estudos realizados, evidenciou-se sempre a ação tóxica das hemaglutininas das leguminosas quando

ministradas a animais experimentais, sugerindo também sua importância no campo da nutrição humana.

Ainda existem outros elementos antinutricionais nos feijões, menos conhecidos, entretanto não menos importantes e que necessitam de futuras investigações, entre os quais os agentes bocígenos e os de flatulência.

#### Agentes bocígenos

Segundo Liener, 1962, parece ter sido McCarrison, 1933, o primeiro a mencionar o efeito goiterogênico em animais alimentados com leguminosas, especificamente com soja. Essa observação foi confirmada desde então por numerosos pesquisadores. Esse efeito é representado pela hipertrofia da tiróide, devida à sua incapacidade de sintetizar o hormônio tiroxina por falta de iodo na dieta ou pela presença de algum agente inibidor de sua assimilação pela glândula.

A presença desses agentes goiterogênicos em *Phaseolus vulgaris* foi referida pela primeira vez por Gree e Ashwood, 1948, que estudaram a inibição da assimilação de iodo radiativo pela tiróide humana.

Jaffê, 1961, baseado nos relatos de pesquisadores que observaram uma grande perda de tiroxina nas fezes de ratos alimentados com soja crua, sugeriu que o princípio tóxico do *Phaseolus vulgaris* poderia ter uma interferência com a absorção dos nutrientes pela mucosa intestinal. Essa perda foi

atribuída ao fato de a reabsorção da tiroxina no intestino, onde foi excretada pela biliar, ter sido inibida na presença de algum fator existente nas leguminosas.

Liener, 1966, referiu-se a produtos de soja que, não tendo sofrido tratamento térmico adequado, produziram um marcado aumento da glândula tireóide (papeira) em ratos e pintos. Esse efeito maléfico pode ser eliminado pela suplementação com iodo ou pela aplicação de tratamento térmico aos produtos de soja que fazem parte da dieta.

Smith e Circle, 1972, ao se referirem à falta de iodo como principal causa do bócio provocado pela ingestão de soja não tratada convenientemente, citam que Bloch e col., 1961, opinaram que a soja crua continha o agente bocígeno, que deveria ser removido ou destruído durante o processamento. A adição de 160mg de iodo na forma de KI em 100g de dieta faz com que a hipertrofia da tireóide desapareça.

Futuras investigações no sentido de isolar este agente de leguminosas responsável pelo efeitos bocígenos na fisiologia humana e animal ainda se fazem necessárias, para seu melhor conhecimento e caracterização.

#### Fatores de flatulência

Uma revisão da literatura mostra que a flatulência pode ser devida a uma série de causas. De qualquer maneira, existe pouca informação avaliável para justificar a larga va-

riação na concentração de dióxido de carbono no processo de flatulência. O total de  $\text{CO}_2$ , em amostras de *flatus*, tem apresentado variação de 1 até 60%.

A flatulência, que é o acúmulo de gases no trato intestinal, representa um inconveniente que acompanha a ingestão de feijões, causando náuseas, diarréias e desconfortável sensação de estufamento e ruído intestinais, por vezes dolorida. Essa característica desencoraja um maior consumo dessas leguminosas de baixo custo e ricas em proteínas.

O mecanismo da produção de gases no intestino tem sido objeto de muitas especulações. Richards e col., 1968, citam que a maioria das informações datam de Kantor, 1918, até trabalhos mais recentes, que sugerem que a associação entre dietas com feijões e produção de gás intestinal é devida à fermentação bacteriana. Após a ingestão de feijão, os gases produzidos são principalmente  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{N}_2$ , o que leva a crer que o maior fator pode ser a secreção intestinal, particularmente as secreções pancreáticas. Esses autores, estudando a relação entre substratos de feijões e certas bactérias intestinais produtoras de gases, concluíram: 1) testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que certas bactérias anaeróbicas no intestino grosso e delgado estão intimamente relacionadas com a produção de gases na presença de produtos contendo feijão "Navy bean" e soja; 2) os gases produzidos *in vitro* contêm alto teor de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , levando a crer que a produção de gás está rela-

cionada com a fermentação por bactérias do tipo *Clostridium*; 3) a produção de gases por feijões foi completamente inibida com antibióticos ou agentes bacteriostáticos; 4) as investigações sugerem que há bactérias anaeróbicas no intestino, especificamente associadas com a formação de gases na presença de produtos contendo feijão.

Rockland e col., 1961, verificaram que feijões em geral contêm um fator não identificado que estimula um rápido crescimento e produção de gases por *Clostridium perfringens* tipo A, que pode ser o indutor da flatulência quando da ingestão de feijões. A produção de gases e o crescimento de *Clostridium perfringens* foram inibidos por antibióticos.

Kakade e Borchers, 1967, estudando a eficiência da produção de gases em ratos alimentados com feijão "Navy bean" cru e cozido, com e sem antibiótico, concluíram: 1) o feijão cru produziu de 4 a 6 vezes mais gases do que a caseína, enquanto o cru produziu apenas de 1 a 2 vezes mais; 2) a adição de antibiótico na dieta com feijão cru reduziu significativamente a produção de gases nos ratos adaptados à ração, não apresentando efeito nos ratos não adaptados.

Hedin e Adachi, 1962, investigaram o efeito do tipo de dieta e tempo de ingestão na produção de gases intestinais em ratos. A dieta com caseína produziu relativamente poucos gases. Com feijão vermelho, a produção de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> e o volume total de gases produzidos aumentaram. Do segundo até o décimo

primeiro dia, houve um gradual decrêscimo na produção de hidrogênio, enquanto a percentagem de CO<sub>2</sub> aumentou até 90%, mantendo-se constante o volume total. O pico diário da produção de gases intestinais ocorreu aproximadamente quatro horas após a ingestão da dieta.

Steggerda e Dimmick, 1966, estudaram o efeito de dietas de feijão na concentração de CO<sub>2</sub> nos gases da flatulência. Eles mostraram que a alta concentração de CO<sub>2</sub> correlacionava-se com o consumo de feijão e não com outras causas suspeitas de serem responsáveis por esse problema. O principal gás produzido no aumento da flatulência foi CO<sub>2</sub>, havendo uma relação direta entre o seu volume e o de feijão consumido em quase todas as amostras. Nem o alto conteúdo de fibras dos feijões, nem a mudança da estrutura dos mesmos pela homogeneização, alterara, o mecanismo de produção de flatulência.

Hellendoorn, 1969, observando o comportamento intestinal após a ingestão de feijões, conclui que: 1) os ratos apresentaram grande formação de gases intestinais, o que não desapareceu totalmente mesmo após autoclavagem ou extração do feijão com álcool; 2) os resultados em humanos foram semelhantes, sendo a flatulência causada pelos cotilédones e não pela casca do feijão; 3) a digestibilidade *in vitro* do amido de feijões foi menor naqueles mal-cozidos. Esse autor enfatizou a importância da descoberta de Murphy, 1963 e 1964, de que o princípio ativo da flatulência tem baixo peso molecular, sen-

do termoestável e podendo ser extraído de feijões cozidos a 60%.

Mesmo com todos os estudos com feijões efevados até o momento, o fator responsável pela indução da flatulência não foi estabelecido, necessitando de futuras investigações, dada a importância de se eliminar tal fator tão depreciativo.

### Composição e valor nutricional

#### Composição das frações protéicas

As proteínas do feijão foram objeto de muitas investigações desde os estudos de Osborne, 1894, que, segundo Jaffé e Haning, 1965, foram os primeiros a relatar que a maioria das proteínas extraíveis eram globulinas, fato comprovado largamente pelos pesquisadores subsequentes.

Lantz e col., 1958, estudando feijões mexicanos, observaram que a localização e ano da cultura exerciam efeito altamente significativo sobre as proteínas e aminoácidos. A variação protéica em função da localização chegou a 50%, como no feijão "Michelite" (*P. vulgaris*), que variou de 23,8 até 34,4%.

Pant e Tulsiani, 1969, estudando 19 leguminosas silvestres, encontraram uma variação protéica de 18 a 47% para a *Glycine hispida*, possibilitando a sua inclusão na dieta animal. De três *Phaseolus vulgaris* analisados - Pink rajmah,

Red rajmah e Bakla - este último apresentou 35,1% de proteínas. Com sucessivas extrações da farinha desses feijões com água e NaCl, foi possível recuperar de 74 a 82% do nitrogênio provenientes de albuminas, globulinas e nitrogênio não-protéico, principalmente. A prolamina representou a menor fração, de 1 a 3%, enquanto o nitrogênio não-protéico foi de 10 a 15%. No resíduo permaneceram 4 a 9% das proteínas (glutelina).

Satterlee e col., 1975, estudaram as propriedades funcionais do feijão "Great northern" (*P. vulgaris*), conseguindo isolar um concentrado protéico com 35% de albuminas e 65% de globulinas, representando uma relação 1:1,85, respectivamente, usando extrações com solução a 2% de NaCl. As albuminas apresentaram boa capacidade de emulsificação, com pouca estabilidade, ocorrendo o contrário com as globulinas.

Sun e Hall, 1975, isolaram do feijão "Franch bean" (*P. vulgaris*) duas frações globulínicas, as quais chamaram de G1 e G2. O ponto isoelétrico da fração G1 foi na faixa de pH 4,4 a 5,6, enquanto que o da fração G2 foi pH 3,7. Por outro lado, Ishino e Ortega, 1975, encontraram que a globulina do feijão "Black mecentral" (*P. vulgaris*), que representa 75% do total das proteínas, contém quatro componentes, que foram designados por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  e  $\delta$ , de acordo com a ordem decrescente de mobilidade eletroforética, contribuindo respectivamente com 50, 19, 10 e 12% da globulina. O componente  $\alpha$  apresentou peso molecular de 170.000 e coeficiente de sedimentação de 7,4S. Es

se componente era uma glicoproteína com 4,95% de manose e 1,19% de glicosamina e deficiente em aminoácidos sulfurados.

Silva e Iachan, 1975a, realizaram estudos em 17 variedades brasileiras de feijão, encontrando uma variação proteica de 22,1 até 31,6%. A maior fração obtida compunha-se de albuminas mais globulinas, solúveis em solução a 1% de NaCl. Usando-se filtração em Sephadex G-100 foi possível isolar quatro frações albumínicas e duas globulínicas.

Jaffé e Haning, 1965, trabalhando com o feijão preto "Kidney bean", conseguiram separar com sulfato de amônio e eletroforese duas frações globulínicas solúveis em sal e nove frações albumínicas solúveis em água. Extração similar de variedades de feijões vermelhos e brancos (*P. vulgaris*) desenvolveu padrões bem diferentes.

Seidl e col., 1969, observaram que uma fração globulínica isolada de feijões pretos (*P. vulgaris*) era resistente à hidrólise por pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína, ficina, ureína e subtilisina, resistência essa que apresentou pemelhoria após desnaturação da globulina pelo calor ou uréia. A atividade das sete proteases citadas sobre seus respectivos substratos foi inibida pela globulina.

Vaitraub e col., 1976, descreveram estudos sobre a digestibilidade *in vitro* da tripsina e quimotripsina em proteínas de 13 espécies de leguminosas. Nas proteínas das espécies *Vicia* foi marcadamente superior à das proteínas das es-

pêcies *Phaseolus*. Em quatro espécies de *Phaseolus* de origem norte-americana (*P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *P. multiflorus*, *P. lunatus*) apresentou-se muito baixa. Agentes desnaturantes aumentaram a proteólise sobre essas proteínas.

#### Metionina e valor nutricional

As leguminosas em geral, incluindo as da espécie *Phaseolus vulgaris*, são grãos ricos em proteínas. Contudo, raras são as espécies que não são pobres nutricionalmente, necessitando de tratamento térmico para eliminar agentes antinutricionais e adição de um ou mais aminoácidos essenciais. Numerosos pesquisadores têm demonstrado serem os aminoácidos sulfurados os mais limitantes, quando comparados com as exigências da FAO/WHO, 1965. Mesmo sendo importante na dieta dos indianos, latino-americanos e africanos, chegando a suprir de 20 a 30% das proteínas da dieta na América Central, as pesquisas sobre seu uso e valor nutricional têm sido negligenciadas. Sendo baixo o nível de aminoácidos sulfurados nos feijões, os mesmos não se prestam para o preparo de dietas protéicas balanceadas. Entretanto, como são ricos em lisina, podem ser um bom complemento para os cereais, como arroz, milho e outros, deficientes nesse aminoácido essencial.

Embora, segundo Swendseid e col., 1970, citado por Kelly, 1971, os requisitos específicos de metionina e cisteína para humanos não tenham sido estabelecidos, uma dieta com

a totalidade das proteínas provenientes de feijões será, seguramente, deficiente. Tendo em conta a importância dos feijões na alimentação de muitos povos, fica denotada a necessidade de se melhorar o seu valor nutricional, seja por melhoramentos genéticos, correção dos aminoácidos deficientes ou pela complementação com outros alimentos. Jaffé, 1950c, publicou importante trabalho sobre uma série de feijões venezuelanos que apresentava deficiência do aminoácido essencial metionina. Segundo Kelly, 1971, os estudos que evidenciaram a necessidade de suplementação dos aminoácidos sulfurados em feijões tiveram início na década de 1950, embora tais estudos com outras leguminosas datem de épocas bem anteriores.

Tandon e col., 1957, mostraram que a metionina foi surpreendentemente limitante em 25 variedades de feijões (*P. vulgaris*) da América Central, enquanto que a lisina foi sempre alta. A concentração de proteína das amostras analisadas variou de 20,1 a 27,9%, com uma média de 24,1%. A composição dos aminoácidos metionina, triptofânio e lisina, em g/16g N, foi 0,80 a 1,39 (média de 1,17), 0,56 a 0,94 (média de 0,68) e 7,22 a 9,22 (média de 8,46), respectivamente.

Bressani e col., 1961, investigando a composição em aminoácidos essenciais em variedades de feijões da Guatemala, concluíram que metionina e cisteína foram os mais limitantes, ficando em segundo e terceiro lugares a leucina e triptofânio, respectivamente. Todas as amostras analisadas continham alto

teor de lisina, fazendo dos feijões uma boa fonte desse aminoácido essencial. Também chegaram a conclusões semelhantes Moraes e Angelucci, 1971, que estudaram 12 variedades de feijão (*P. vulgaris*) cultivadas no Brasil, bem como Baldi e Salamini, 1973, que estudaram a variação de aminoácidos essenciais em 22 espécies de *Phaseolus*. Esses autores encontraram uma variação de metionina mais cisteína de 0,7 a 1,56g/16g N e 1,51 a 3,8g/16g N, respectivamente, valores inferiores aos recomendados pelo padrão FAO/68.

Jaffé e Brucher, 1974, estudando 100 linhagens puras de feijões quanto ao teor de proteínas e aminoácidos sulfurados, encontraram: 1) o valor médio para proteínas foi de 22,7%; 2) os valores médios para metionina e cisteína, em g/16g N, foram respectivamente 1,12 e 0,98, confirmando serem esses os aminoácidos limitantes. Esses resultados confirmam e ampliam as observações de Kelly, 1971, que encontrou evidências da existência de fatores genéticos que determinam o nível de metionina em feijões. Kelly estudou a variação genética da metionina de feijões cultivados nos Estados Unidos, concluindo que: 1) de 3.600 cultivares e linhagens analisadas, apenas 82 tiveram mais de 33% de metionina microbiologicamente disponível; 2) os níveis de metionina foram mais altos nas linhagens cruzadas do que nas puras, levando a crer na possibilidade de se poder selecionar linhagens com maior teor de metionina.

Ratos alimentados com dieta contendo feijão autoclavado como fonte de proteínas tiveram um pequeno crescimento, mas quando a mesma foi suplementada com metionina apresentou resultados comparáveis com a caseína, conclusões a que chegaram Brassani e col., 1963, Kakade e Evans, 1965b e Evans e Bandemer, 1967. Esses pesquisadores verificaram que ratos alimentados com dieta de feijão cru, com ou sem suplementação de metionina, morreram em menos de 14 dias. A digestibilidade das proteínas não melhorou com a sua adição ou de outros aminoácidos, embora o valor biológico e aumento de peso tenham melhorado significativamente com a adição de apenas 0,2% de metionina no feijão autoclavado.

Kakade e col., 1969, observaram que a indisponibilidade da cisteína do inibidor da tripsina foi um fator que contribuiu para o baixo valor nutritivo do feijão "Navy bean". A resistência do inibidor da tripsina deste feijão ao ataque de enzimas digestivas parece ser o maior fator envolvido na baixa disponibilidade da cisteína para o crescimento de pintos. Isso é importante porque o teor de cisteína no inibidor de tripsina dessa variedade de feijão chega a 15,5g/16g N, enquanto na amostra integral é de apenas 1,0g/16g N. Assim, ele acentua a deficiência de cisteína, em virtude de seu conteúdo desproporcional, não podendo o animal usá-la para as suas necessidades de crescimento. É também possível que, sob certas condições, essa deficiência possa ser intensificada pela habilidade do

inibidor da tripsina de impedir a proteólise da dieta e, assim, estimular a produção de enzimas pancreáticas, excretadas pelas fezes, causando uma perda de cisteína de origem endógena.

Evans e col., 1974, tentaram explicar as razões da baixa utilização de metionina e de cisteína das proteínas de feijões e da soja, mesmo com tratamento térmico adequado. Ratos jovens foram alimentados com dieta contendo 10% de proteínas de feijão ou de soja, com ou sem suplementação de metionina. O crescimento máximo de mais altos valores de PER foram obtidos quando a proteína da dieta de feijão continha 3,3% de metionina mais cisteína e, para a soja quando esse valor foi de 2,6%. Isso indica que a metionina mais a cisteína nos feijões são menos utilizáveis pelos ratos em crescimento do que na soja. Aproximadamente 49% da metionina e 25% da cisteína contidas nos feijões foram excretadas nas fezes com a proteína não digerida, valores que para a soja foram de 26 e 11%, respectivamente. Somente cerca de 1% da metionina e 2 a 9% da cisteína foram excretadas na urina. O total de metionina e cisteína na proteína não digerida, concorre para a má utilização desses aminoácidos.

A despeito de serem deficientes em metionina, a mesma não está totalmente disponível nos feijões e ainda há perdas durante o processamento térmico. Shemer e Perkins, 1975, verificaram que a metionina adicionada à proteína de soja e

fervida em água por 30 minutos foi destruída em condições aeróbicas. Parte da metionina adicionada foi degradada para  $\beta$ -metilmercaptopropionato (metional). Os experimentos mostraram que na proteína à qual ela não foi adicionada também houve uma redução de 30% em seu teor, pela formação de metional. Quando se procedeu ao aquecimento sob vácuo, as perdas foram menores.

Pant e Tulsiani, 1969, estudando as proteínas de variedades de feijões silvestres, observaram que a fração globulina representa boa fonte protéica sob o aspecto nutricional, desde que seja suplementada com metionina, seu aminoácido essencial mais limitante. Citam ainda que a albumina é semelhante nutricionalmente à globulina, mas que sua extração não é econômica, por representar apenas 7% do total das proteínas extraídas. Os testes de PER com a fração globulina autoclavada, deram valores de 2,1 para o feijão "Red rajmah", 1,3 para o "Pink rajmah" e perda de peso para o feijão "Bakla".

Antunes e Markakis, 1977, mostraram que a proteína do feijão "Navy bean", deficiente em aminoácidos sulfurados, pode ser largamente melhorada quando misturada com castanhas-do-Pará (*Bertholletia excelsa*) do Brasil, que são excepcionalmente ricas em metionina, com 6,18g/16g N. Dietas com esse feijão, moído e autoclavado por 10 minutos a 121°C, deram um PER de 1,53 quando comparados com 2,5 para a caseína, enquanto que aquelas com proteínas de feijão e castanhas nas proporções de 80:20, 90:10 e 95:5 forneceram valores de PER de 2,42,

2,16 e 1,95, respectivamente, com um total de 10% de proteínas.

#### Alterações das propriedades originais de feijão com o tempo e condições de armazenamento

Mesmo sendo os feijões importantes fontes de proteínas, com custo menor do que a proteína animal, seu baixo consumo *per capita* nos Estados Unidos continua decrescendo. Isso é atribuído ao longo tempo requerido para sua cocção. O advento dos produtos pré-cozidos ou dos alimentos de cozimento rápido tem tornado o problema do difícil cozimento dos feijões um importante desafio a ser resolvido. Provavelmente, por ser o feijão um dos alimentos mais estáveis, poucos são os trabalhos sobre a qualidade em função do armazenamento. Entretanto, é do conhecimento geral que, quanto maior o tempo de armazenamento, maior será o tempo necessário para o cozimento.

Norris e Wood, 1956, verificaram que a umidade do grão é dos mais importantes fatores na conservação da qualidade dos feijões. Nas suas observações, relataram que a umidade acima de 13% foi altamente prejudicial, promovendo deterioração rápida, enquanto que abaixo de 10% e armazenamento a 25°C não promoveram apreciável perda de qualidade, mesmo por um período prolongado.

Muneta, 1964, estocou quatro espécies de *Phaseolus vulgaris* e outras leguminosas em armazéns de metal galvanizado e a temperatura ambiente, variando de 20 a 37°C. O tempo de

armazenamento foi de 18 meses, por ser esse um período maior do que o normalmente utilizado para um feijão comerciável. Esse autor destacou como principais observações: 1) o tempo de cozimento variou muito para uma mesma variedade quando plantada em locais diferentes; 2) importante fator no aumento do tempo de cocção foi umidade de armazenamento, sempre maior quanto maior o teor de umidade do feijão; 3) é possível que a oxidação e polimerização dos lipídios causem mudanças na permeabilidade dos tecidos do grão, o que por sua vez afeta o tempo de cocção.

Suspeitando da possível correlação entre o tempo de cozimento e a composição lipídica, Takayama e col., 1965, estudaram quatro espécies de *Phaseolus vulgaris* e outras leguminosas, tendo sido todas as amostras plantadas em duas localidades diferentes. Esses pesquisadores verificaram que não houve correlação significativa entre triglicerídeos, fosfatídeos ou lipídios totais e o tempo de cocção dos feijões. Preocupados com o mesmo problema, Burr e col., 1968, estudaram o efeito da umidade, temperatura e tempo de armazenamento no cozimento. Dessa pesquisa, os autores concluíram que qualquer aumento na umidade (acima de 10%), na temperatura e no tempo de armazenamento contribui acentuadamente para piorar as qualidades de cozimento dos feijões. Um feijão "Pinto bean", armazenado por 7 meses a 32°C, teve seu tempo de cocção aumentado 14 vezes, passando de 24 para 340 minutos. O aumento do tempo de armaze

nagem resultou em aumento do tempo de cocção. Com umidade abaixo de 10% e temperatura de 80°C, não houve aumento significativo no tempo de cocção quando o feijão foi armazenado por dois anos.

Kon, 1968, de posse dos resultados referentes às alterações nos feijões armazenados, mencionadas por vários autores, especialmente por Burr e col., 1968, procurou verificar se a interferência no tempo de cozimento dos feijões estocados com alta umidade e temperatura era devida a mudanças nas substâncias pécnicas. Ele verificou que o feijão "Sanilac bean" cultivado no estado de Michigan, estocado por 4 anos a 32°C com 8,1 e 13,3% de umidade, necessitou respectivamente de 29 e 210 minutos para a cocção, não havendo entretanto alteração significativa no teor das substâncias pécnicas. Isso leva a crer não ser esta a responsável por tal alteração.

Rockland e Metzler, 1967, desenvolveram um processo rápido de cozimento de feijões cultivados nos Estados Unidos com grande variação nas características de cocção. O método consiste, fundamentalmente, em submeter o feijão a um vácuo intermitente por 30 a 60 minutos, em solução de sal contendo NaCl, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, deixando-o a seguir por mais 6 horas nessa solução, quando é lavado e secado. O seu tempo de cozimento variou de 25 a 35 minutos, sendo bem maior antes desse tratamento. O feijão tratado, com uma umidade de 8,5 a 9,5%, pode ser armazenado por 6 meses sem haver perda nas suas qualidades de cocção.

Molina e col., 1976, aqueceram feijão preto em grãos por 2, 5 e 10 minutos, a 121°C, e 10, 20 e 30 minutos, sob vapor a 98°C. Esses autores verificaram que tais tratamentos não afetaram a aparência física, mas diminuíram significativamente o desenvolvimento do fenômeno de endurecimento dos grãos estocados a 25°C e 70% de umidade relativa, por 9 meses. Após esse tempo, não houve diferença significativa entre a dureza ao cozimento dos feijões tratados e do controle armazenado a 4°C.

Molina e col., 1974, estudaram a interrelação entre o tempo de maceração, tempo de cocção e valor nutritivo das proteínas do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*), variedade S-19-N da Guatemala, em função do tempo e das condições de armazenamento que foram: a) 3 meses a temperatura de 22-25°C e 60-70% de umidade relativa e b) 6 meses a 21°C e 77% de umidade relativa. Nesses experimentos foi dada ênfase às seguintes observações: 1) houve um aumento no tempo de cocção em autoclave a 121°C de 10 minutos para o feijão recém-colhido para 20 a 30 minutos no final do armazenamento, em ambas as condições acima referidas; 2) a estocagem foi prejudicial ao valor biológico das proteínas do feijão submetido a qualquer tratamento estudado; 3) a solubilidade das proteínas foi afetada pelo período de armazenamento para todos os solventes usados; 4) houve um aumento na metionina e lisina durante os 6 meses de armazenamento, para o que não houve nenhuma explicação.

De todos os estudos realizados com o objetivo de elucidar as alterações ocorridas nos feijões armazenados, são poucas as explicações para os fenômenos ocorridos na depreciação das características de cocção e do valor nutricional. Face a isso, fica evidenciada a necessidade de maiores pesquisas para explicar essas mudanças.

## MATERIAL E MÉTODOS

## Material

## Material utilizado no preparo das amostras

O material usado para os estudos foi o feijão da variedade Rosinha G2, safras de 1976 e 1977, fornecido pela Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo.

Foram feitos estudos no feijão integral, cru e cozido, sob várias condições, no feijão estocado por tempos variáveis e em diferentes condições de umidade relativa do ar e de temperatura, no feijão macerado em solução de metionina e também em frações isoladas do feijão integral.

## Ingredientes (nutrientes) para os ensaios biológicos

Utilizaram-se produtos comerciais técnicos ou farmacêuticos, com exceção dos sais minerais quimicamente puros e de diversas procedências, a saber: caseína livre de vitaminas (Difco), caseína comercial (Indústria e Comércio de Laticínios TACRIGY Ltda.), amido de milho grau alimentício (Refinações de Milho Brasil), óleo de soja comercial (Primor), sacarose (Açúcar Refinado União), vitaminas grau farmacêutico (Merck), metionina e cisteína (Sigma e Carlo Erba).

## Reagentes para as análises químicas e bioquímicas

Os reativos utilizados para as análises químicas foram todos de grau analítico e de diversas procedências (Merck, Baker, Sigma, Ecibra, Carlo Erba, etc.). Para as análises bioquímicas, as enzimas foram protease de *Streptomyces griseus* (Sigma), quimotripsina de pâncreas bovino (Calbiochem), pancreatina de pâncreas de porco (BDH-Biochemicals), tripsina de pâncreas bovino (Sigma) e pepsina.

## Aparelhos e equipamentos

Na execução das análises químicas, bioquímicas, físicas e nos ensaios biológicos, além da vidraria, aparelhos e utensílios indispensáveis de laboratório, utilizaram-se os seguintes equipamentos e aparelhos específicos:

- Analisador de aminoácidos Beckman, Modelo 120C;
- Liofilizador Virtis, Modelo 10-146 MR-BA;
- Centrífuga refrigerada Sorvall, Modelo RC2-B;
- Freezer Revco, Modelo ULT-1250-A-3;
- Autoclave Lufanco, Steril-Matic;
- Câmara com temperatura e umidade relativa controladas;
- Shaker com temperatura controlada;
- Espectrofotômetro Perkin-Elmer, Modelo 402;
- Potenciômetro Corning, Modelo Digital 110;
- Moinho de martelo, Lab. Pulverizing Mill 5S2624;
- Instron, Modelo A 1020-C;
- Gaiolas de tela e chapas galvanizadas para ratos.

## Animais utilizados nos ensaios biológicos

Utilizaram-se ratos brancos recém-desmamados, de am bos os sexos, da linhagem "Wistar", com 21 a 25 dias de idade (30-45g) no início dos ensaios, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo.

## Métodos

### Preparo das amostras no laboratório

#### Farinha integral

O feijão em grão, com cerca de 10% de umidade, foi moído até granulometria de 70 mesh, em moinho de martelo.

#### Farinha descorticada

O feijão foi macerado em água por 12 horas a temperatura ambiente e a seguir descorticado, secado em corrente de ar a 35°C e moído até granulometria de 70 mesh, em moinho de martelo.

#### Casca moída

A casca do feijão foi extraída após o mesmo ter sido macerado por 12 horas, sendo secada em corrente de ar a 35°C e moída.

#### Farinha extraída com etanol a 70%

A farinha integral de feijão, preparada como descrito acima, foi submetida a 8 extrações sucessivas com etanol a 70%, na proporção sólido/líquido 1:3 (p/v). Após as extrações, a farinha foi secada em corrente de ar morno (35°C).

#### Farinha de feijão autoclavado

O feijão foi macerado em água por 12 horas a temperatura ambiente, na relação de 1:3 (p/v). Seguiu-se a eliminação da água de maceração e autoclavagem com as amostras submersas em água por 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, a 121°C, findo o que as amostras foram liofilizadas e moídas em moinho de martelo, até granulometria de 70 mesh.

#### Farinha de feijão cozido sob pressão atmosférica

O feijão foi macerado nas mesmas condições anteriores e, após substituir a água de maceração por igual volume de água destilada, aqueceu-se até fervura por 0,0, 1,0, 2,0, 2½, 3,0, 4,0, 5,0, 7½, 10,0, 15,0, 30,0, 60,0 e 120,0 minutos, sob pressão atmosférica normal, sendo as amostras a seguir liofilizadas e moídas em moinho de martelo até granulometria de 70 mesh.

#### Sólidos solúveis em água

Com a farinha integral preparada conforme descrito

anteriormente, foram feitas 3 extrações sucessivas com água destilada, na relação 1:4 (p/v), seguidas de centrifugação a 8.000xg por 10 minutos e combinando-se com os sobrenadantes. O extrato total foi liofilizado e acondicionado em frascos bem vedados.

#### Sólidos insolúveis em água

Essa fração foi constituída pelo resíduo insolúvel em água da extração dos solúveis totais e, após liofilizada, foi também acondicionada em frascos vedados.

#### Fração albumina

Foi obtida a partir da extração com solução a 2% de NaCl. O extrato foi dialisado contra água destilada por 48 horas e centrifugado a 8.000xg por 10 minutos, sendo que o sobrenadante continha a fração albumina composta por proteínas solúveis em água. Esse material, após liofilização, foi igualmente guardado em frascos bem vedados.

#### Fração globulina

Essa fração foi constituída pelo precipitado da dialise do extrato salino em água, liofilizada e guardada em frascos bem vedados.

### Isolado protéico total (albuminas + globulinas)

Essa fração foi constituída pelo extrato salino to tal dialisado em água destilada, liofilizado e acondicionado em frascos de vidro.

### Material dialisável

Material que atravessa a membrana de diálise por oso mose (PM < 8.000). Após liofilizado, foi acondicionado em frascos herméticos. Essa fração contém elevado teor de açúcares e outras substâncias altamente higroscópicas.

### Frações protéicas autoclavadas

As frações de albuminas, globulinas e isolado pro téico total, preparados conforme descrito acima, foram suspen sas em água destilada até concentração de 5% de sólidos to tais e autoclavados a 121°C por 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 15 e 30 minutos. A se guir, foram liofilizados e guardadas em frascos bem vedados.

### Feijão macerado em solução a 1% de metionina

Os grãos de feijão foram macerados em solução a 1% de metionina por 1 hora a 50°C, na relação 1:2 (p/v) e, em se guida, secados ao sol até atingir seu peso original. Para a incorporação nas dietas, o material foi macerado em água (12h) e cozido com e sem a água de maceração, liofilizado e moído em moinho de martelo até 70 mesh.

### Feijão macerado em solução a 5% de metionina

Os grãos de feijão foram macerados em solução de metionina a 5%, mantendo-se a relação sólido/líquido, tempo e temperatura como no tratamento com a solução de metionina a 1% anteriormente descrito. A seguir, uma parte desses grãos foi lavada em água corrente e a outra não, sendo ambas colocadas para secar ao sol. Depois de secos, os grãos lavados foram misturados com feijão testemunha na proporção 1:4 e os não lavados 1:7, respectivamente.

Para incorporação nas dietas, essas amostras foram tratadas de maneira idêntica às maceradas com solução de metionina a 1%.

### Feijão estocado em prateleira no laboratório

O feijão, em sacos de fibras de algodão, foi estocado por 6 meses em prateleira no laboratório, à temperatura de 22-25°C e 65-70% de umidade relativa. Aos 0, 2, 4 e 6 meses foram retiradas amostras para análises físicas, químicas e bioquímicas no grão ou na farinha integral, preparada a partir do mesmo. Nos períodos de 0, 3 e 6 meses foram retiradas amostras para testes biológicos, sendo maceradas em água por 12 horas a temperatura ambiente na relação 1:3 (p/v), seguindo-se o cozimento após a eliminação da água de maceração, em panela sob pressão atmosférica normal durante o tempo necessário para ótimo cozimento dos grãos, em cada época de estoca-

gem. Esse tempo foi anotado e o critério adotado para a sua fixação foi o ponto ótimo de cozimento estabelecido pelos provadores. Isso feito, as amostras foram liofilizadas e moídas em moinho de martelo até granulometria de 70 mesh.

#### Feijão estocado em câmara refrigerada e desumidificada

O feijão, em sacos de fibra de algodão, logo após a colheita, foi estocado por 6 meses na câmara refrigerada da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas mantida à temperatura de 12°C e 52% de umidade relativa. Com o feijão nessas condições, procedeu-se de maneira idêntica à descrita para o feijão estocado em prateleira no laboratório.

#### Feijão estocado em estufa a 37°C e 76% de umidade relativa

O feijão, logo após a colheita, foi estocado a 37°C e 76% de umidade relativa na câmara de temperatura controlada do laboratório de microbiologia desta Faculdade, pelo período de 6 meses. A umidade relativa foi mantida por uma solução de ácido sulfúrico a 31% (Wilson, 1921), colocada no mesmo compartimento que a amostra em cubas de vidro herméticas. Com o feijão estocado nessas condições, procederam-se os mesmos estudos que para o feijão estocado no laboratório e na câmara refrigerada e desumidificada, acima descritos.

## Análises químicas e físicas

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

### Umidade

A umidade foi determinada segundo o método descrito no AOAC, procedimento 7.003, 1970. As amostras foram levadas à estufa a 100-105°C até peso constante, a partir do que se calculou a percentagem de umidade.

### Cinzas

A determinação das cinzas foi feita segundo o método descrito na AOAC, procedimento 7.010, 1970. As amostras, em cadinhos de porcelana, foram carbonizadas lentamente em chapa quente, sendo a seguir levadas à mufla por 6 horas a 550-600°C. Após essa incineração, os cadinhos foram colocados em dessecador até temperatura ambiente, pesados e calculada a percentagem de cinzas na amostra original, por diferença.

### Extrato etéreo

Determinou-se segundo o método descrito no AOAC, procedimento 7.048, 1970, utilizando-se o aparelho de extraçãõ

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 bruta

A proteína bruta foi determinada pelo método semimicro-Kjeldahl, descrito no AOAC, procedimento 2.23, 1955, para nitrogênio total, valor que, multiplicado pelo fator 6,25, representa a percentagem de proteína bruta.

#### Nitrogênio não-protéico

Determinado segundo o método descrito por Becker e col., 1940. Na execução do método usaram-se 5g de amostra em 50ml de água destilada, agitando-se magneticamente por 1 hora, seguindo-se a adição de 50ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, agitação por mais 10 minutos, filtração e determinação do nitrogênio (Kjeldahl) no filtrado, sendo este o nitrogênio não-protéico.

#### Nitrogênio protéico

Calculado por diferença entre o nitrogênio total e o não-protéico da amostra.

#### Fibra bruta

Determinada pelo método descrito no AOAC, segundo o

procedimento 7.054, 1975.

### Carboidratos

Calculados pela diferença entre 100% e a soma dos componentes analisados.

### Solubilidade das proteínas em água e em NaCl

Na realização deste ensaio, seguiram-se fundamentalmente as recomendações de Belter e Smith, 1952, com adaptações para as condições de trabalho. Com amostras que não sofreram tratamento térmico, foram preparadas suspensões na proporção de 1:100 (p/v), tanto para a água destilada como para solução a 2% de NaCl, agitando-se em agitador magnético por 30 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se filtração e determinação da proteína no sobrenadante (%N x 6,25), a partir do que se calculou a percentagem de extração em função do teor de proteína bruta da amostra.

### Eletroforese em gel simples de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada segundo o método de Davis, 1964, ligeiramente modificado por Constantinides e col., 1976. Na realização dos testes foram usadas as seguintes soluções:

- a) 60g de acrilamida, 0,5g de N-N'-metilenobisacrilamida (BIS) em 130ml de água destilada;

- b) tampão tris-HCl 3,0M, pH 8,8, contendo 0,23% de N-N'-N'-N'-tetrametilenodiamina;
- c) solução 0,14% de persulfato de amônio;
- d) 10g de acrilamida, 2,5g de N-N'-metilenobisacrilamida (BIS) em 100ml de água destilada;
- e) 4mg de riboflavina em 100ml de água destilada;
- f) tampão tris-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,46% de N-N'-N'-N'-tetrametilenodiamina.

A parte experimental foi realizada usando-se tubos de vidro de 9,5cm de comprimento por 0,5cm de diâmetro, fixados verticalmente em um suporte e preenchidos, com o auxílio de uma seringa até atingir 7,5cm de altura, com uma solução preparada na hora com as soluções a) e b) e água destilada, nas proporções respectivas de 2,44, 2,62, 2,44ml e mais 5ml de solução c). Para evitar a formação de uma superfície côncava pelo efeito da tensão superficial, foi adicionado lentamente, para não diluir a superfície do gel, 0,5ml de água destilada. Os tubos assim preparados foram deixados em repouso por aproximadamente 30 minutos para formação de gel, após o que se retirou a água superficial com o auxílio de papel absorvente. A seguir, foi preparado o gel superior com as soluções d), e), f) e água destilada nas proporções respectivas de 1,0, 0,5, 0,5 e 0,4ml, o qual, com uma seringa, foi colocado nos tubos até uma altura de 1cm. Para evitar a formação côncava do gel, procedeu-se da mesma maneira que para o gel inferior. Os tubos

foram então deixados em repouso por 15 minutos, sendo a polimerização auxiliada pela incidência de luz fluorescente. Após eliminar a água superior, os tubos foram retirados do suporte e colocados no aparelho de eletroforese. Seguiu-se a adição de tampão tris-glicina 0,005M, pH 8,2, contendo 2 gotas de azul de bromofenol a 0,5%, tanto no compartimento superior como no inferior do aparelho, conectando-se o eletrodo negativo na parte superior e o positivo na inferior. As amostras foram preparadas em tampão tris-glicina 0,005M, pH 8,2, contendo 2% de sacarose, sendo a concentração final de proteínas de 1mg/ml. A seguir colocou-se lentamente, com o auxílio de uma pipeta especial, 0,2ml de amostra na superfície do gel superior, conectando-se os eletrodos a uma fonte de potencial elétrico, marca Ortec, modelo 4100. Iniciou-se a eletroforese mantendo-se a corrente constante em 2,5mA/tubo, até o corante atingir a superfície do gel inferior, aumentando-se para 4mA/tubo, até o final da corrida, momento em que o corante aproxima-se do final do gel inferior (cerca de 2 horas). Os géis foram retirados dos tubos e imersos por 10 minutos em solução de amido Schwartz a 1% em 7,5% de ácido acético glacial, com a finalidade de fixar as proteínas. A descoloração foi feita em 48-60 horas, através de lavagens sucessivas com ácido acético glacial a 7,5%. A seguir, foi medida a mobilidade relativa de cada banda (MR), dividindo-se a distância percorrida pela banda pela distância percorrida pelo corante. A intensidade relativa de cada banda foi anotada como sendo fraca, média ou forte.

### Capacidade de absorção de água

Nesta determinação, maceraram-se 100g de feijão por 6 horas a temperatura ambiente, a partir do que se determinou a capacidade de absorção de água pela diferença de peso entre o feijão antes e após a maceração.

### Casca dura ("hardshell") ou impermeabilizada

Maceraram-se 200 grãos de feijão por 6 horas a temperatura ambiente, a partir do que se determinou a percentagem de grãos que não absorveram água ("hardshell"), isto é, grãos com a casca dura ou impermeabilizada.

### Textura medida no Instron

Na realização desse ensaio, usaram-se amostras de feijão estocadas em diferentes condições de temperatura e umidade relativa. As amostras foram maceradas por 12 horas em água a temperatura ambiente, na relação 1:3 (p/v). Seguiu-se a cocção por 30 minutos, sob pressão atmosférica, resfriamento, até 30°C, e medida reológica, pelo processo de extrusão, usando-se uma célula de 7x7cm, com furos de 0,6cm de diâmetro. A velocidade de extrusão foi de 10cm/minuto. Os resultados foram expressos em kg-força na célula extrusora, segundo estudos realizados por Bourne e Moyer, 1968, e Bourne e col., 1966.

### Lisina disponível pelo método químico

Usaram-se os reagentes e o procedimento descritos no método de Kakade e Liener, 1969, : ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfônico (TNBS), para complexar com o grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> da lisina, formando o composto " $\epsilon$ -TNP-lisina". Esse complexo colorido pode ser determinado pela leitura da absorvância em 346nm, relacionando-se com uma curva padrão.

### Metionina determinada por colorimetria

Usaram-se os reagentes e o procedimento descritos no método de Lunder, 1973, que se baseia na reação com nitroprussiato de sódio em meio ácido, dando coloração que pode ser lida em 520nm, avaliando-se o teor de metionina através de uma curva padrão.

### Triptofânio determinado por colorimetria

O triptofânio foi determinado pelo método colorimétrico de Spies, 1967, que está baseado na hidrólise enzimática das proteínas e reação colorimétrica com N-dimetil p-amino benzaldeído (p-DAB) e leitura a 600nm, relacionada com uma curva padrão de triptofânio.

### Aminoácidos totais

Foram determinados pelo método de troca iônica de Spackman e col., 1958, usando-se um Analisador Beckman, modelo

120°C. Seguiram-se basicamente as recomendações descritas no manual do aparelho para o preparo das amostras, Beckman Instruments, 1966, a saber: 1) 25mg de proteínas e 15ml de HCl 6N em tubo de vidro que foi congelado com N<sub>2</sub> líquido e fechado em chama sob vácuo; 2) seguiu-se a hidrólise por 22 horas, a 110°C, filtrando-se o hidrolisado em filtro de vidro G-4 e completando-se o volume para 50ml; 3) tomou-se 20ml dessa solução e, em evaporador rotativo com banho a 45°C, evaporou-se o HCl, lavou-se o resíduo 3 vezes com 20ml de água destilada por vez; 4) dissolveu-se o hidrolisado final em 10ml de tampão citrato de sódio pH 2,2 (correspondendo a 1mg de proteínas por ml); 5) procedeu-se a cromatografia, colocando-se 0,4 ml dessa solução, tanto para aminoácidos básicos como para aminoácidos neutros e ácidos; 6) corrido o aminograma, calculou-se quantitativamente os aminoácidos das amostras, exceto o triptofânio, que é destruído na hidrólise ácida.

### Análises bioquímicas

#### Digestibilidade *in vitro*

Usaram-se os reagentes e o procedimento descritos por Akeson e Stahmann, 1964, que estão baseados na hidrólise enzimática das proteínas em pH ácido com pepsina, seguida de hidrólise em condições alcalinas com pancreatina, determinando-se a seguir o nitrogênio (Kjeldahl) não precipitável com TCA.

### Atividade do inibidor da tripsina

Foi determinada basicamente segundo o método original descrito por Kunitz, 1947, que emprega caseína como substrato e leitura espectrofotométrica a 280nm dos aminoácidos liberados na hidrólise em função de uma concentração de tripsina. Foram introduzidas algumas modificações ao método, tais como: 1) 2% de caseína, em lugar de 1%; 2) cálculo das unidades de tripsina inibidas, segundo recomendação de Kakade e col., 1969; 3) mistura de reação com quantidade, atendendo às condições de trabalho. Na determinação da atividade inibitória do fator antitripsina, usaram-se na mistura de reação de 0,1 a 0,3mg de proteínas do extrato contendo o inibidor, o que resultou na melhor atividade nas condições do método.

Levando-se em conta a definição de unidade de tripsina (UT) como sendo o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 280nm 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.

### Atividade inibitória da quimotripsina

Foi medida basicamente segundo o método original descrito por Kunitz, 1947, que emprega caseína como substrato e leitura espectrofotométrica dos aminoácidos liberados na hidrólise, em função de uma concentração de quimotripsina. As modi

ficações feitas foram aquelas sugeridas por Kakade e col., 1970, que usaram cálcio na reação para garantir a linearidade entre a atividade da quimotripsina sobre a caseína e a concentração da enzima. Nessa determinação, usaram-se na mistura de reação de 0,1 a 0,3mg de proteínas do extrato contendo o inibidor, o que resultou na melhor atividade nas condições do método. A unidade de quimotripsina (UQT) foi definida como para a tripsina e calculada dividindo-se a absorvância por 0,01 ou uma unidade. A atividade do inibidor (UQTI) foi dada pela diferença entre a atividade da quimotripsina na ausência (atividade máxima) e na presença do inibidor.

#### Atividade da hemaglutinina

Utilizou-se, fundamentalmente, o método descrito por Liener, 1955, que se baseia na grande sensibilidade de aglutinação dos eritrócitos, especialmente de coelhos, tratados com tripsina, quando em presença da hemaglutinina. Neste trabalho, a avaliação da aglutinação, em lugar de ser fotométrica, foi por observação visual, sendo levada em conta a concentração minima de proteínas no extrato capaz de provocar aglutinação dos eritrócitos tripsinizados.

Para a realização do ensaio, o extrato de feijão foi diluído com soro fisiológico, de maneira a conter proteínas de 1mg até 0,000488mg/ml. O extrato, nas suas diferentes diluições, foi misturado com a suspensão de eritrócitos na pro

porção de 1:1. Deixou-se em repouso a temperatura ambiente, por 1 hora. Centrifugou-se por 5 minutos a baixa rotação (200xg) e observou-se qual a concentração mínima de proteínas capaz de produzir aglutinação dos eritrócitos tratados com tripsina.

#### Inativação dos fatores antinutricionais

Preparou-se extratos de feijão em água e em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6, com teor de proteínas de 1mg/ml, que foram aquecidos em banho-maria fervente e em autoclave a 121°C, por tempos diferentes, quando foram medidas as atividades dos inibidores de tripsina, quimotripsina e hemaglutinina. Calculou-se a percentagem de inativação ou ativação desses fatores em função dos diferentes tratamentos térmicos, tomando-se o extrato cru como referência ou atividade 100%. Foi feito também estudo de inativação desses fatores antinutricionais no feijão tratado em condições diferentes de tempo e temperatura, usado na elaboração das dietas para os testes biológicos.

#### Ensaio biológicos

Para estudo da qualidade nutricional das proteínas nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos, determinaram-se o quociente da eficiência protéica (PER), a digestibilidade aparente, a absorção da metionina e a disponibilidade de metionina e de cisteína, utilizando-se ratos em crescimento. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em

gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum*. Em todos os ensaios a caseína foi usada como proteína-padrão na base de 10% da dieta.

#### Preparo das dietas

Na realização dos ensaios biológicos, foram preparadas dietas, cuja composição centesimal está basicamente especificada em Allison, 1964, Friedman, 1975, e no AOAC, procedimento 43.183, 1975. As proporções usadas estão representadas no Quadro 1, sendo que nos Quadros 2 e 3 estão representados os valores da composição das misturas salina e vitamínica usadas nas dietas.

Quadro 1: Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos

Componentes	Porcentagem
Proteínas (provenientes da cada amostra)	10
Gordura (óleo de soja comercial)	8
Sais minerais (V. Quadro 2 )	4
Vitaminas (V. Quadro 3 )	2
Sacarose (açúcar refinado comercial)	25
Amido (amido de milho comercial)	para 100

Quadro 2: Composição centesimal da mistura salina usada nas dietas para os ensaios biológicos

Componentes	Percentagem
Molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,003
Carbonato de cálcio $\text{CaCO}_3$	29,290
Fosfato de cálcio $\text{CaHPO}_4$	0,430
Sulfato cúprico $\text{CuSO}_4$	0,156
Citrato férrico $\text{Fe}^{+3} + (\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	0,620
Sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,980
Sulfato de manganês $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,121
Iodeto de potássio $\text{KI}$	0,0005
Fosfato de potássio $\text{K}_2\text{HPO}_4$	34,310
Cloreto de sódio $\text{NaCl}$	25,060
Selenito de sódio $\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0,002
Cloreto de zinco $\text{ZnCl}_2$	0,020

Fonte: ROGERS, Q.R. & HARPER, A.E. *J. Nutr.*, 87:267-273, 1965.

No Quadro 3, encontra-se especificada a mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos. A composição 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, especificada no ICN Diet Catalog, 1977 e 1978.

Quadro 3: Composição centesimal da mistura vitamínica utilizada nas dietas para os ensaios biológicos

Componentes (mg)*	Composição de Warner**	Composição da NBC***	Composição preparada no laboratório
Vitamina A	10.000	90.000	90.000
Vitamina D	10.000	10.000	10.000
Biotina	0,5	2,0	2,0
Vitamina E	300,0	500,0	500,0
Vitamina K	0,5	225,0	150,0
Vitamina B6	6,0	100,0	50,0
Vitamina B12	0,025	0,135	0,1
Inositol	50,0	500,0	200,0
Niacina	75,0	450,0	200,0
Riboflavina	12,5	100,0	50,0
Cloridrato de tiamina	6,25	100,0	50,0
Ácido fólico	5,0	9,0	7,0
Pantotenato de cálcio	40,0	300,0	200,0
Ácido p-aminobenzóico	50,0	500,0	200,0
Cloridrato de colina	3.750,0	7.500,0	7.500,0
Ácido ascórbico	-	4.500,0	4.500,0
Etoxiquim	-	-	2.000,0
Dextrose, veículo p/100g	95.704,2	85.213,9	-
Sacarose e farinha de mandioca torrada (50%+50%), veículo p/100g	-	-	84.390,9

\*Exceto para Vitaminas A e D, que estão em unidades internacionais (U.I.).

\*\* WARNER, R.G. NAS/NRC, publication nº990, p.51-81, 1962.

\*\*\* Nutritional Biochemicals Corporation, Diet Catalog da ICN, Cleveland, Ohio, EUA, p.24, 1977 e 1978.

### Quociente de eficiência protéica (PER)

Na avaliação biológica das proteínas, através do quociente de eficiência protéica (PER), foi usado o método descrito por Osborne e col., 1919, amplamente revisado por Allison, 1964, e apresentado no AOAC, procedimentos 43.183-43.187, 1975.

Na realização dos ensaios foram usados ratos brancos de ambos os sexos (50%+50%) da linhagem "Wistar", com idade de 21 a 25 dias (30-45g) no início do ensaio, mantidos em gaiolas individuais com água e dieta *ad libitum*, pelo período de 28 dias. Findo esse período, foram calculados os valores de PER, dividindo-se os ganhos de peso em gramas pela proteína consumida, também em gramas, tendo-se a caseína como padrão. A composição centesimal das dietas foi sempre a representada no Quadro 1. Os ensaios tiveram início após 24 horas de adaptação nas dietas experimentais, tendo-se pesado inicialmente os ratos e a dieta a eles administrada. A partir dessa pesagem, estabelecida como início, foram feitas pesagens regulares a cada 7 dias, pelo período de 4 semanas (1ª, 7ª, 14ª, 21ª e 28ª dias). As pesagens foram feitas sempre a fim de obter o peso de cada rato e respectiva ração consumida. Calculou-se em função do mesmo teste, em alguns casos: 1) ganho de peso por rato e por dia; 2) ingestão de dieta por rato e por dia; 3) eficiência da ração, que foi o quociente do ganho de peso pela dieta ingerida, multiplicado por 100.

### Digestibilidade aparente das proteínas

Para esta determinação utilizaram-se as mesmas rações e ratos dos ensaios de PER. Os ratos foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas, com água e dieta *ad libitum*, por 4 dias de adaptação e 6 dias de ensaio, depois do que se estimou a digestibilidade aparente das proteínas, pela determinação do nitrogênio total ingerido e excretado nas fezes. O cálculo foi feito pelo quociente do nitrogênio absorvido pelo ingerido e multiplicado por 100.

### Disponibilidade biológica da metionina e cisteína

Na avaliação da disponibilidade de metionina e cisteína, usou-se o procedimento da adição desses aminoácidos em níveis crescentes nas dietas elaboradas com o feijão tratado em diferentes condições e preparadas segundo a composição centesimal referida no Quadro 1. Para a disponibilidade de metionina, as dietas foram enriquecidas com 0,9% de cisteína e com concentrações crescentes de metionina com base de proteína das dietas (0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8 e 2,0%). Para a disponibilidade de cisteína, as dietas foram enriquecidas com 0,6% de metionina e com concentrações crescentes de cisteína, com base na proteína das dietas (0,2, 0,4 e 0,6%). Os ensaios foram realizados com ratos nas mesmas condições dos testes de PER, mantidos individualmente em gaiolas com água e comida *ad libitum*, por 10 dias, findo o que se estimou a disponibilidade dos

aminoácidos sulfurados em função da curva de crescimento dos ratos e do conhecimento do conteúdo de metionina e cisteína nas amostras.

#### Absorção biológica da metionina

Na avaliação da absorção da metionina livre adicionada ao feijão, foi usado o procedimento de balanço de metionina, conforme trabalhos de Evans e col., 1974, e Evans e Bauer, 1978, estabelecendo a relação entre a metionina ingerida e a excretada nas fezes, desprezando-se a excretada na urina, por não ser superior a 1,5%, segundo esses autores.

Para os ensaios, foram utilizados ratos nas mesmas condições dos testes de PER, mantidos em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*, por 10 dias, sendo 5 de adaptação, findo o que se estimou a absorção da metionina pela subtração da quantidade ingerida pela eliminada nas fezes e multiplicado por 100.

#### Análise sensorial

Análise sensorial do feijão macerado em solução de metionina

Num primeiro dia de ensaio, a avaliação sensorial foi realizada empregando-se o método Psicofísico de Comparação Pareada Direcional, para medir a preferência a nível de laboratório, Amerine e col., 1965, Garruti, 1976, e Sgarbieri e col., 1978.

Usaram-se as amostras de feijão macerado em soluções a 1 e a 5% de metionina e feijão sem maceração como testemunha. Essas amostras foram maceradas em água destilada por 12 horas e cozidas na mesma água, em panela de pressão, colocando-se a seguir porções de 10g em bequers de 50ml, mantidos em aquecedor especial com temperatura controlada entre 45-50°C. Nessas condições, os provadores (equipe composta de 5 homens e 5 mulheres na faixa etária de 20-40 anos) receberam 3 pares de tratamentos por sessão de prova, com intervalos de 30 segundos, e deveriam indicar, dentro de cada par, a amostra preferida, conforme modelo representado na Figura 1.

Num segundo ensaio, a avaliação sensorial foi realizada empregando-se o método de Escala Não-Estruturada de 9cm, para medir a preferência a nível de laboratório, Amerine e col., 1965, Raffensperger e col., 1956, e Baten, 1946.

Usaram-se amostras de feijão macerado em solução a 5% de metionina, sendo esse feijão lavado ou não após a maceração e feijão testemunha. Essas amostras foram maceradas em água destilada por 12 horas e cozidas na mesma água, sem e com tempero (1%), em panela de pressão. Em seguida colocou-se 10g das amostras em bequers de 50ml, mantidos em aquecedor especial (45-50°C) e nessas condições foram apresentadas aos provadores (equipe composta de 5 homens e 5 mulheres na faixa etária de 20-40 anos), que deveriam indicar para cada amostra a sua opinião sobre os parâmetros sensoriais de odor e gosto, expressando a preferência na escala, conforme Figura 2.

## Análise estatística dos resultados da avaliação sensorial

Com os resultados da análise de preferência pelo método Psicofísico de Comparação Pareada Direcional, determinou-se a preferência dada em frequência, baseando-se na tabela de significância para o teste pareado bicaudal, Roessler e col., 1956, Garruti, 1976. O número de repetições para cada tratamento foi de 4, sendo o delineamento estatístico pareado (3 pares do tratamento com 4 repetições).

Com os resultados da análise de preferência pelo método de Escala Não-Estruturada, estudou-se: a) análise da variância, Cochran e Cox, 1957, Gomes, 1970, sendo o esquema estatístico de delineamento em blocos casualizados (3 tratamentos x 6 repetições), e b) teste de Dunnett para significância estatística das diferenças entre médias para o testemunha e para os tratamentos, Dunnett, 1955.

## Teste Pareado - preferência.

Nome \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_  
Produto \_\_\_\_\_

Dentro de cada par, faça um círculo na amostra que você pre  
ferir. Se desejar, faça outros comentários. Lave a boca entre u  
ma amostra e outra.

Par

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fig. 1: Modelo de ficha usada no teste Psicofísico de Comparação Pareada Direcional para avaliação de preferência.

## Escala Não-Estruturada - preferência

Nome \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_  
 Produto \_\_\_\_\_

Por favor, prove cada amostra e dê a sua opinião sobre ODOR e GOSTO, usando as escalas abaixo. Se desejar, faça outros comentários. Lave a boca entre uma amostra e outra.

## ODOR

Nº amostra	Estranho	Normal
_____	-----	
_____	-----	
_____	-----	

## GOSTO

Nº amostra	Muito ruim	Muito bom
_____	-----	
_____	-----	
_____	-----	

Comentários: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Fig. 2: Modelo de ficha usada no teste de Escala Não-Estruturada para avaliação de preferência.

## RESULTADOS

Estudo da composição e da toxicidade do feijão integral e das frações isoladas por extração e diálise

Nos Quadros 4, 5, 6 e 7, apresentam-se os valores das determinações químicas, físicas e da toxicidade determinada *in vitro* e *in vivo* nas amostras preparadas no laboratório, utilizadas no preparo das dietas para os ensaios biológicos.

### Principais componentes

No Quadro 4, estão os resultados das determinações, expressas em percentagem de proteína bruta (%Nx6,25), substâncias nitrogenadas solúveis em ácido tricloroacético a 5%, multiplicadas por 6,25, fibra bruta, extrato etéreo, cinza e carboidratos, determinados por diferença entre o valor 100 e a soma dos componentes determinados. Os dados são a média de várias determinações e estão expressos em base seca.

Os resultados indicam que a proteína variou de 15,1% nos sólidos insolúveis em água a 89,6% na fração globulina; o nitrogênio não-protéico foi mais baixo nos sólidos insolúveis e mais elevado no material dialisável em água, sendo os valores, respectivamente de 0,62% e 18,51%; a variação das cinzas foi de 0,87% para os sólidos insolúveis a 17,13% para o material dialisável; a fibra bruta esteve presente apenas na farinha integral e nos sólidos insolúveis; os carboidratos desde 9,15% para a fração globulina até 74,4% para os sólidos inso-

lúveis.

É interessante observar o elevado valor de substâncias nitrogenadas solúveis em ácido tricloracético (TCA) da fração albumina, mesmo após a diálise. Isto parece significar que existe uma quantidade relativamente elevada de polipeptídeos de peso molecular suficientemente elevado nessa fração para não serem eliminados pela diálise, mas que não precipitam com o TCA na determinação do nitrogênio não-protéico.

Quadro 4: Composição aproximada da farinha crua de feijão Rosinha G2 e de 6 mate-  
riais diferentes, resultantes do fracionamento da mesma (base seca)

Material analisado*	Proteína bruta (%Nx6,25)	Substância nitrogenada solúvel em TCA 5% (%Nx6,25)	Cinza %	Extrato etéreo %	Fibra bruta %	Carboidrato %
Farinha	26,34	3,74	3,15	1,42	5,12	63,97
F1	82,37	3,37	1,52	0,08	0,00	16,12
F2	70,27	7,83	3,39	0,06	0,00	26,28
F3	89,65	1,05	1,03	0,16	0,00	9,16
F4	50,16	10,94	8,96	0,77	0,00	40,11
F5	15,09	0,62	0,87	1,40	7,74	74,90
F6	20,37	18,51	17,13	0,26	0,00	62,24

\* Farinha integral preparada a partir do feijão cru, granulometria de 70 mesh.

F1, isolado protéico total (albuminas + globulinas).

F2, fração albumina.

F3, fração globulina.

F4, sólidos solúveis em água.

F5, sólidos insolúveis em água.

F6, sólidos dialisáveis.

No Quadro 5, apresentam-se os resultados das determinações de aminoácidos totais. Os resultados estão expressos em gramas de aminoácidos por 16g de nitrogênio.

Os resultados mostram que, com exceção do material dialisável, todas as frações tiveram a composição em aminoácidos mais ou menos semelhante. O material dialisável, visto ser composto de elementos de baixo peso molecular, praticamente sem proteínas, apresentou um aminograma desequilibrado, notando-se inclusive a ausência de alguns aminoácidos. Nas demais frações a lisina foi alta, variando de 7,5 a 8,7g/16g N. A metionina foi praticamente constante em todas as frações (média de 0,84g/16g N), mostrando ser o aminoácido limitante, segundo o padrão da FAO, 1965. Esses valores de metionina foram baixos para todas as amostras, uma vez que pelo método colorimétrico direto de Lunder, 1973, foram praticamente o dobro. Essa diferença foi provavelmente devida à hidrólise ácida (110°C, 22 horas), que destruiu boa parte da metionina. O aminoácido cisteína apresentou apenas traços em algumas frações, o que não é devido à sua ausência e sim à sua grande facilidade de de degradação durante a hidrólise. O valor do triptofânio variou de 0,57 até 1,69, exceto para a fração albumina, que apresentou um valor de 3,2g/100g de proteínas, que pode ser considerado excepcionalmente alto.

Quadro 5: Composição em aminoácidos da farinha crua de feijão Rosinha G2 e de 6 materiais resultantes do fracionamento da mesma farinha (g/16g N)\*

Amino- ácidos	Material analisado**						
	Farinha	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Lys	7,74	7,87	7,52	8,02	7,74	8,86	1,49
Thr	5,12	5,49	6,49	4,85	4,77	5,24	1,01
Val	4,34	5,68	6,18	6,21	4,72	6,41	0,94
Met	0,82	0,82	0,82	0,90	0,78	0,90	0,37
Ile	4,23	4,92	5,15	5,84	4,13	5,77	0,46
Leu	9,71	9,84	10,04	12,50	8,17	12,27	1,74
Phe	5,82	6,84	6,53	7,72	4,75	6,40	0,79
Trp***	1,28	1,69	3,21	1,19	1,41	0,57	0,24
His	2,56	2,83	2,48	3,53	2,75	4,23	1,47
Arg	5,48	4,45	4,34	5,59	6,66	6,88	8,17
Asp	17,11	16,77	16,64	20,33	16,84	18,54	10,88
Ser	7,62	7,63	7,67	8,59	6,02	7,94	0,66
Glu	24,79	17,82	16,63	24,21	19,20	23,73	23,62
Pro	3,94	3,85	4,17	4,06	3,43	4,72	-
Gly	4,62	41,3	5,01	4,67	3,66	5,80	1,07
Ala	4,61	4,61	5,21	4,81	2,38	5,26	1,52
1/2 Cys	0,76	t	1,61	t	t	0,67	0,79
Tyr	2,95	2,99	3,35	3,40	2,45	3,13	0,36
NH <sub>3</sub>	1,96	2,12	2,13	3,88	2,21	1,92	2,43

\* Troca iônica segundo Spackman e col., 1958, Analisador Beckman 120C.

\*\*Farinha integral preparada com feijão cru; F1, isolado proteico total(albuminas+globulinas); F2, fração albumina; F3, fração globulina; F4, sólidos solúveis em água; F5, sólidos insolúveis em água; F6, material dialisável.

\*\*\*Método colorimétrico de Spies, 1967.

### Atividade de fatores antinutricionais

No Quadro 6, apresentam-se os valores encontrados nas determinações de atividade do inibidor de tripsina e de quimotripsina e a atividade aglutinante das fito-hemaglutininas, atividade essa expressa na capacidade de aglutinar as hemácias tripsinizadas de bovinos.

Os resultados mostram que a atividade do inibidor de tripsina, bem como a de quimotripsina, foi alta para algumas frações e baixa para outras. A fração albumina foi a que apresentou a maior atividade desses fatores, com 376 unidades de tripsina inibidas por miligrama de proteína (UTI/mg) e 115 unidades de quimotripsina inibidas por miligrama (UQI/mg). A fração globulina apresentou pequena atividade, ou seja 63UTI/mg de proteínas e 23UQI/mg de proteínas, sendo que valores mais baixos foram encontrados apenas na fração dos sólidos insolúveis em água, 17UTI/mg e 19UQI/mg de proteínas.

A maior atividade da hemaglutinina foi encontrada na fração albumina, que acusou aglutinação quando a concentração de proteínas na mistura de reação foi de apenas 0,12µg/ml. As demais frações apresentaram uma atividade de hemaglutinação um pouco menor, sendo a mais baixa a da fração de sólidos insolúveis em água, 1,25µg/ml, seguindo-se a da farinha integral, que necessitou de 0,49µg/ml para provocar a aglutinação dos glóbulos vermelhos de sangue bovino tripsinizado.

Quadro 6: Atividade dos fatores antinutricionais da farinha crua do feijão Rosinha G2 e de 5 diferentes materiais obtidos pelo fracionamento dessa farinha

Material analisado	Atividade do inibidor de tripsina (UTI/mgProt)*	Atividade do inibidor de quimotripsina (UQI/mgProt)*	Atividade da fito-hemaglutinina ( $\mu$ g Prot/ml)**
Farinha integral	161,3	41,8	0,49
Isolado protéico total	173,7	78,2	0,19
Fração albumina	376,4	115,2	0,12
Fração globulina	63,8	23,7	0,25
Sólidos solúveis em água	239,4	65,8	0,39
Sólidos insolúveis em água	17,4	19,2	1,25

\*Unidades de tripsina e de quimotripsina inibidas por miligrama de proteínas.

\*\*Concentração mínima de proteína, na mistura de reação, capaz de provocar aglutinação dos eritrócitos tripsinizados de bovino.

## Ensaio biológicos de toxidez

No Quadro 7, apresentam-se os valores encontrados em testes de alimentação em que a farinha de feijão crua e frações isoladas da mesma foram as únicas fontes de proteínas utilizadas nas dietas. Com a farinha integral foram feitos também testes em que se adicionaram 1,5 e 3,0% de metionina na base protéica da dieta. Nesses ensaios foi calculada a variação de peso corporal e a ingestão de dieta por dia e por rato. No mesmo Quadro encontram-se também o período letal, em dias, para as diferentes dietas.

Os resultados mostram que todas as amostras foram muito tóxicas. A julgar pelo período letal, pode-se dizer que as amostras constituídas dos compostos solúveis em água foram as mais tóxicas. Assim, as dietas elaboradas com a farinha integral, material dialisável, fração albumina, sólidos solúveis em água e o isolado protéico total (albuminas+globulinas) foram as mais tóxicas, matando os ratos no período de 3 a 10 dias. As frações constituídas dos sólidos insolúveis em água foram as menos tóxicas, levando, respectivamente, 10-14 e 12-23 dias para a morte de todos os ratos submetidos ao teste. A toxidez não está ligada à casca, uma vez que a dieta com farinha de feijão descorticado foi ainda mais tóxica do que com a farinha integral. Os compostos tóxicos também não foram extraídos com etanol, porque a dieta preparada com farinha extraída com etanol a 70% foi tão tóxica quanto a integral. A fração

dialisável foi a mais tóxica, o que deve ser atribuído a vários fatores, como deficiência em quase todos os aminoácidos, exceto o ácido glutâmico, porém a morte dos animais em tão curto tempo evidencia a presença, na dieta, de componentes tóxicos, já que a dieta livre de proteínas não matou os ratos em 10 dias e a perda diária de peso foi bem menor. O enriquecimento com metionina também não eliminou o efeito tóxico, tendo apenas diminuído um pouco a perda de peso dos ratos em ensaio, quando comparado com a farinha integral sem metionina.

Quadro 7: Toxidez biológica relativa da farinha crua de feijão Rosinha G2 e de diferentes materiais obtidos por fracionamento dessa farinha\*

Fonte de proteínas nas dietas	Varição corporal de peso (g/rato/dia)	Ingestão de dieta (g/rato/dia)	Período letal para os ratos (dias)
Farinha integral	-1,61	2,49	4-8
Farinha+1,5%metionina**	-1,41	2,78	4-8
Farinha+3%metionina**	-1,11	2,95	4-9
Farinha descorticada	-1,79	3,09	3-7
Farinha extraída c/etanol	-1,21	3,74	3-10
Sólidos solúveis em água	-2,44	3,79	5-9
Sólidos insolúveis em água	-0,90	2,00	10-14
Fração albumina	-2,02	2,91	6-10
Fração globulina	-1,12	4,38	12-23
Isolado protéico total	-1,53	3,03	5-9
Material dialisável	-2,68	3,19	3-7
Dieta s/proteína***	-0,53	3,10	-
Dieta padrão c/caseína	+2,49	7,83	-

\*Ratos desmamados, linhagem "Wistar", mantidos em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*.

\*\*Porcentagem de metionina em base protéica da dieta.

\*\*\*Dieta com todos os ingredientes, menos a proteína que foi substituída pelo amido. Os ratos permaneceram 10 dias na dieta, sem ter havido nenhuma morte.

Efeito do tratamento térmico sobre as propriedades nutricionais das proteínas do feijão e na eliminação de fatores tóxicos

Quociente de eficiência protéica, digestibilidade e fatores antinutricionais no feijão integral

No Quadro 8, estão os valores do quociente de eficiência protéica (PER), de digestibilidade *in vivo*, atividade do fator antitripsina e da hemaglutinina no feijão que sofreu tratamento térmico em água fervente (97°C) por tempos diferentes. Utilizou-se a caseína na dieta padrão.

Os resultados indicam que o tratamento térmico em água fervente, até 10-15 minutos, melhora o PER, tornando-se prejudicial com tempos mais prolongados. Isso mostra que os agentes tóxicos são extremamente termolábeis e que o decréscimo no valor nutricional, à medida que prolongamos o tratamento térmico, deverá ser atribuído ao efeito nocivo do calor. Tratamento térmico por 2 $\frac{1}{2}$  minutos em água fervente já apresentou um PER de 0,91, que foi melhor do que 30 minutos do mesmo tratamento ou 15 minutos em autoclave a 121°C. A digestibilidade *in vivo* foi praticamente a mesma para todos os tratamentos, cerca de 63%, mostrando não ser este o fator responsável pela melhoria ou queda do valor nutricional em função do tratamento térmico. A inativação do fator antitripsina foi de 66% aos 2 $\frac{1}{2}$  minutos de tratamento térmico em água fervente e de 95,5% aos 30 minutos, sendo 100% a inativação com 7 $\frac{1}{2}$  minutos de autoclave a 121°C. A hemaglutinina apresentou

alguma atividade até os 15 minutos de aquecimento a 97°C.

Na Figura 3, apresentam-se as curvas de crescimento médio dos ratos utilizados nos ensaios de PER correspondente ao Quadro 8.

Lisina disponível pela reação com trinitrobenzenosulfato (TNBS)

No Quadro 9, apresentam-se os valores de lisina disponível nas frações de feijão com diferentes tempos de tratamento térmico em autoclave a 121°C. Os valores representam a média de 2 determinações e são expressos em gramas de lisina por 16g de nitrogênio.

Pela observação dos resultados fica evidente que houve redução na disponibilidade de lisina em quase todas as amostras, quando foi aumentado o tempo de tratamento térmico. Na farinha integral, quando no estado cru, a lisina disponível foi de 6g/16g N, tendo baixado em quase 50% esse valor, já aos 5 minutos de aquecimento, valor esse que não variou mais no decurso do tratamento térmico. A fração dos sólidos insolúveis totais também apresentou comportamento semelhante. As demais frações não apresentaram redução significativa durante o tratamento.

É interessante o fato de que o material dialisável, com 2,5g/16g N de lisina (Quadro 5), não apresentou lisina disponível, mesmo na amostra sem nenhum tratamento térmico.

Quadro 8: Efeito do tratamento térmico sobre o valor nutricional das proteínas do feijão Rosinha G2 utilizado nas dietas como única fonte de proteínas\*

Tratamento térmico dos grãos (minutos)	PER ± DP	Digestibilidade <i>in vivo</i> %	Atividade residual do inibidor de tripsina %	Atividade residual da hemaglutinina (µgProt/ml)***
Água fervente (97°C)	-**	-**	100,00	0,49
2 1/2	0,91±0,32	62,37	34,18	37,00
5	1,04±0,24	62,93	21,57	75,00
10	1,15±0,22	63,47	13,26	600,00
15	1,02±0,26	63,06	11,07	2.400,00
30	0,69±0,27	62,28	4,58	(-)
Autoclave (121°C)				
7 1/2	0,80±0,25	61,20	0,00	(-)
15	0,60±0,30	61,11	0,00	(-)
Dieta com caseína	3,36±0,27	93,37		

\*Ratos da linhagem "Wistar", mantidos em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum* por 28 dias.

\*\*Os ratos morreram no período de 4-8 dias.

\*\*\*Concentração mínima de proteínas capaz de causar hemaglutinação.  
(-) reação negativa.

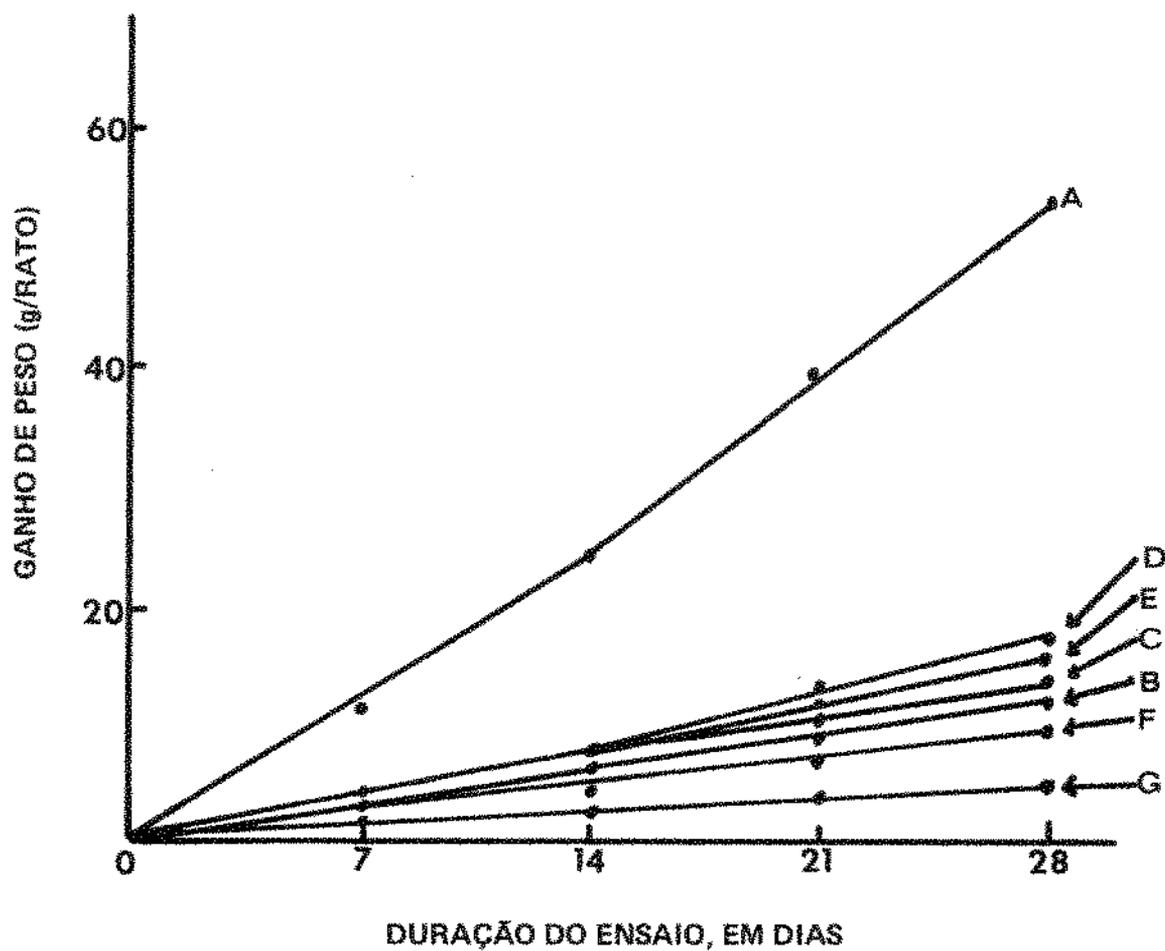


Fig. 3: Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 8) do feijão Rosinha G 2 submetido a diferentes tratamentos térmicos. A, caseína; B, C, D, E e F, feijão aquecido em água (97°C) por 2 1/2, 5, 10, 15 e 30 minutos, respectivamente; G, feijão autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Quadro 9: Efeito do tratamento térmico na disponibilidade de lisina da farinha de feijão Rosinha G2 e de 6 materiais obtidos por fracionamento da mesma\*

Amostras	Tratamento térmico, minutos a 121°C				
	0	5	15	30	60
Farinha integral	6,0	3,8	3,8	3,5	3,5
Isolado protéico total	6,0	6,4	6,3	6,1	6,0
Fração albumina	6,3	6,1	6,1	5,7	5,7
Fração globulina	6,5	7,1	6,5	6,2	6,2
Sólidos solúveis em água	6,3	6,3	5,9	5,9	5,9
Sólidos insolúveis em água	4,1	3,2	2,9	2,9	2,9
Material dialisável	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

\*Método colorimétrico de Kakade e Liener, 1969.

Quociente de eficiência protéica e digestibilidade de frações protéicas isoladas

No Quadro 10, estão os valores de PER, bem como de digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de frações protéicas de feijão submetidas a diferentes tempos de autoclavagem a 121°C. Em todos os casos utilizou-se a caseína como dieta padrão de controle.

Nas Figuras 4, 5 e 6, apresenta-se as curvas de crescimento médio dos ratos utilizados nos ensaios biológicos (PER) correspondentes ao Quadro 10.

A observação dos resultados mostra que qualquer das frações estudadas apresentou acentuado decréscimo no valor biológico e no aumento de peso em função do aumento do tempo de tratamento térmico. Isso mostra que o tratamento térmico foi benéfico até um certo limite, a partir do que resultou em depreciação. Verificou-se que em todas as frações estudadas, a autoclavagem por 7½ minutos forneceu o melhor PER, apesar de ainda terem sido baixos em relação aos valores comumente encontrados para o feijão. A fração albumina foi a que deu o PER mais alto, 0,72, mostrando ser constituída de proteínas de valor biológico muito baixo, especialmente tendo-se em conta que a caseína forneceu um PER de 3,36. A digestibilidade *in vivo* variou entre 82 e 86%, não tendo sido afetada pelos tratamentos térmicos aplicados. A digestibilidade *in vitro* esteve ao redor de 63% para as albuminas, 78% para as globulinas e 66% para o isolado protéico total (albuminas+globulinas). A digestibilidade *in vitro* decresceu um pouco com o aumento do tempo de tratamento térmico.

Quadro 10: Efeito do tratamento térmico sobre o valor biológico (PER) e digestibilidade das frações protéicas isoladas do feijão Rosinha G2 comparado com a caseína\*

Fonte protéica das dietas**	Autoclavagem a 121°C (minutos)	PER ± DP	Digestibilidade	
			<i>in vitro</i> %	<i>in vivo</i> %
F1	7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	0,68±0,28	66,86	85,42
	15	0,63±0,21	66,28	85,89
	30	0,53±0,30	64,16	85,08
F2	7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	0,72±0,22	63,82	81,82
	15	0,51±0,28	63,12	82,17
	30	0,45±0,23	59,45	83,11
F3	7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	0,59±0,31	79,23	85,93
	15	0,43±0,20	78,72	85,71
	30	0,13±0,22	76,82	84,48
Caseína		3,36±0,27	99,30	93,37

\*Ratos recém-desmamados, da linhagem "Wistar", mantidos em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum* por 28 dias.

\*\*F1, isolado protéico total.

F2, fração albumina.

F3, fração globulina.

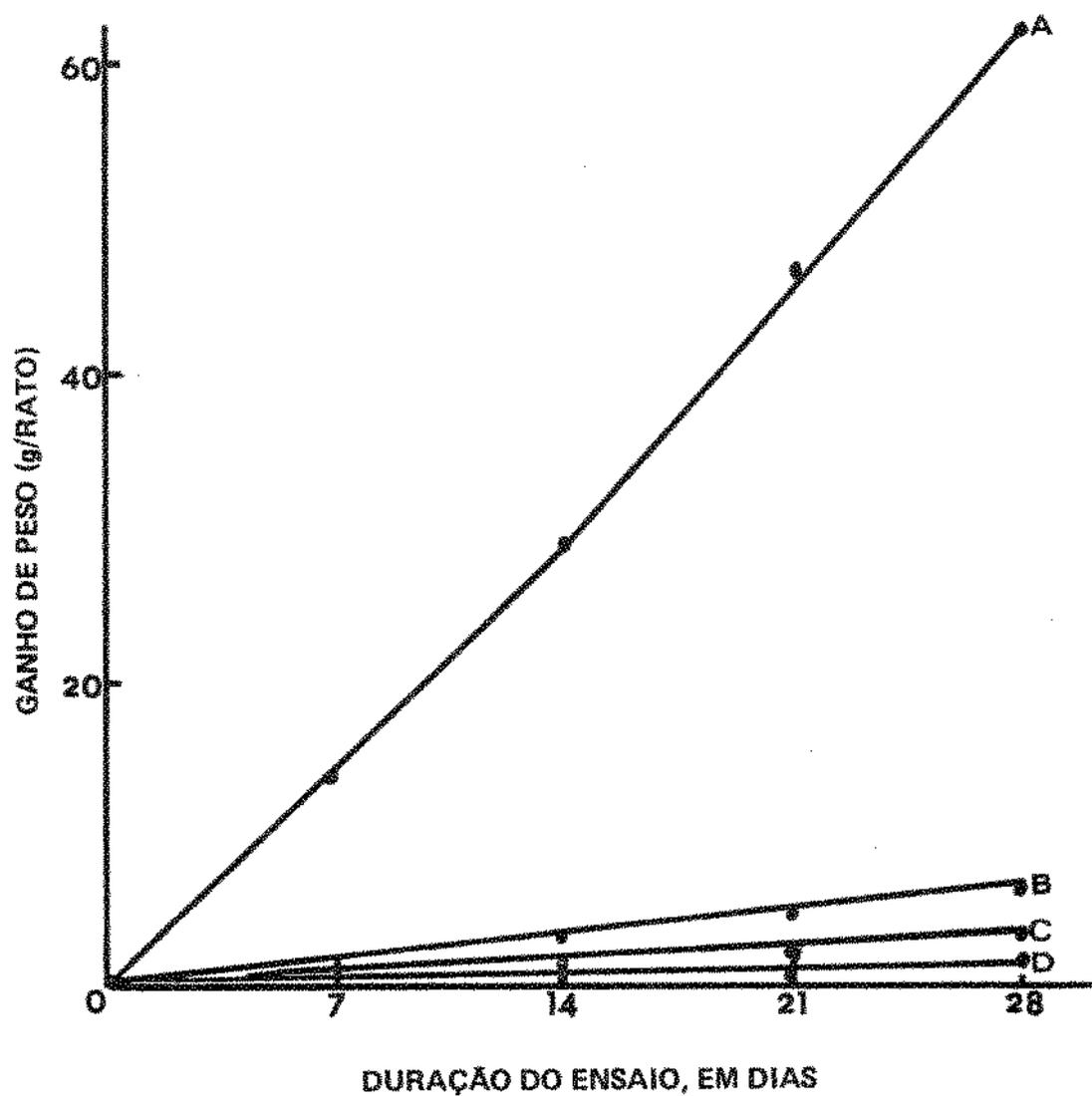


Fig. 4: Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 10) com a fração albumina do feijão Rosinha G 2, autoclavada por tempos diferentes. A, caseína; B, C e D, albumina autoclavada a  $121^{\circ}\text{C}$  por 7 1/2, 15 e 30 minutos, respectivamente.

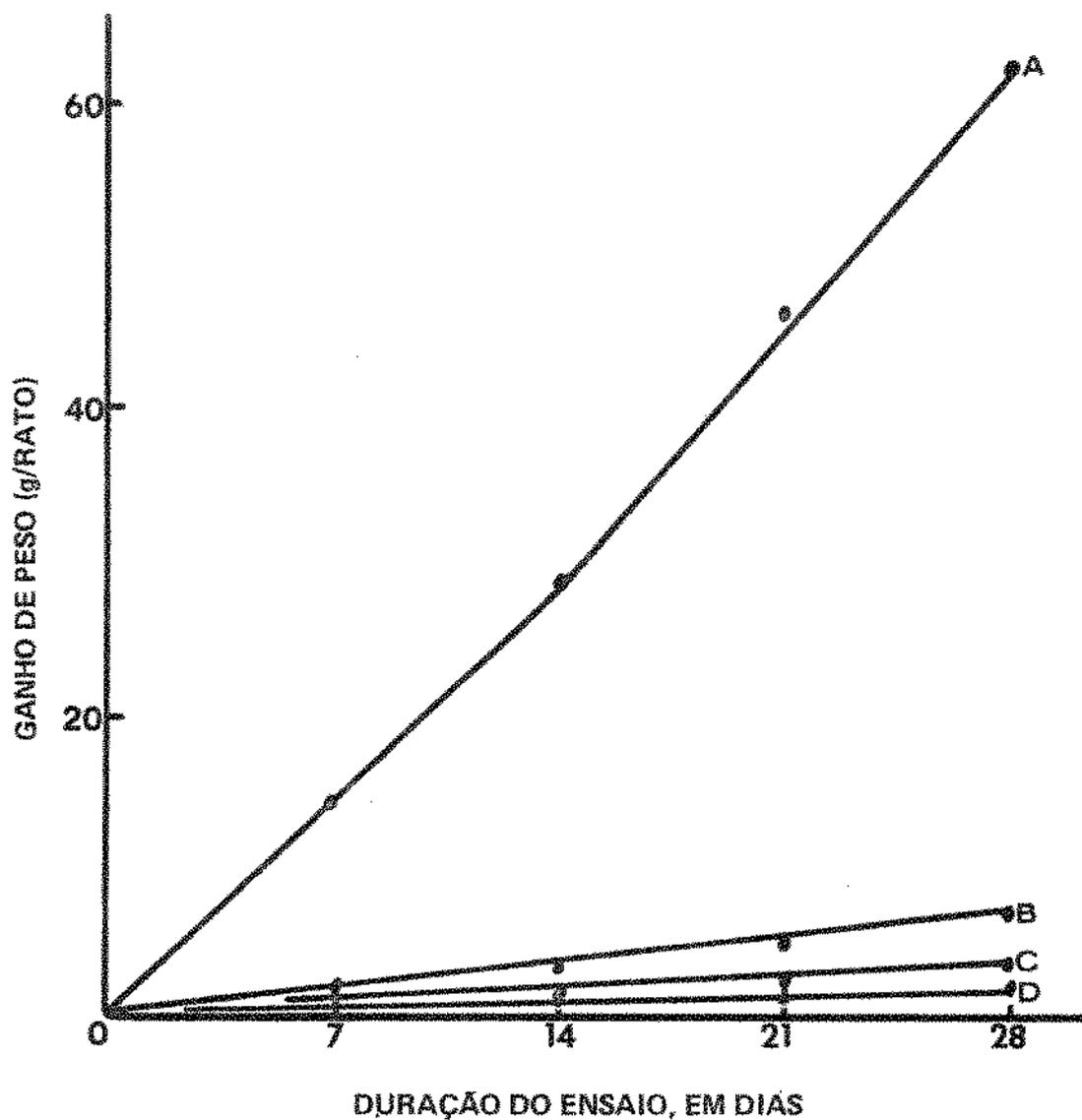


Fig. 5: Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 10) com a fração globulina do feijão Rosinha G 2 autoclavada por tempos diferentes. A, caseína; B, C e D, globulina autoclavada a 121°C por 7 1/2, 15 e 30 minutos respectivamente.

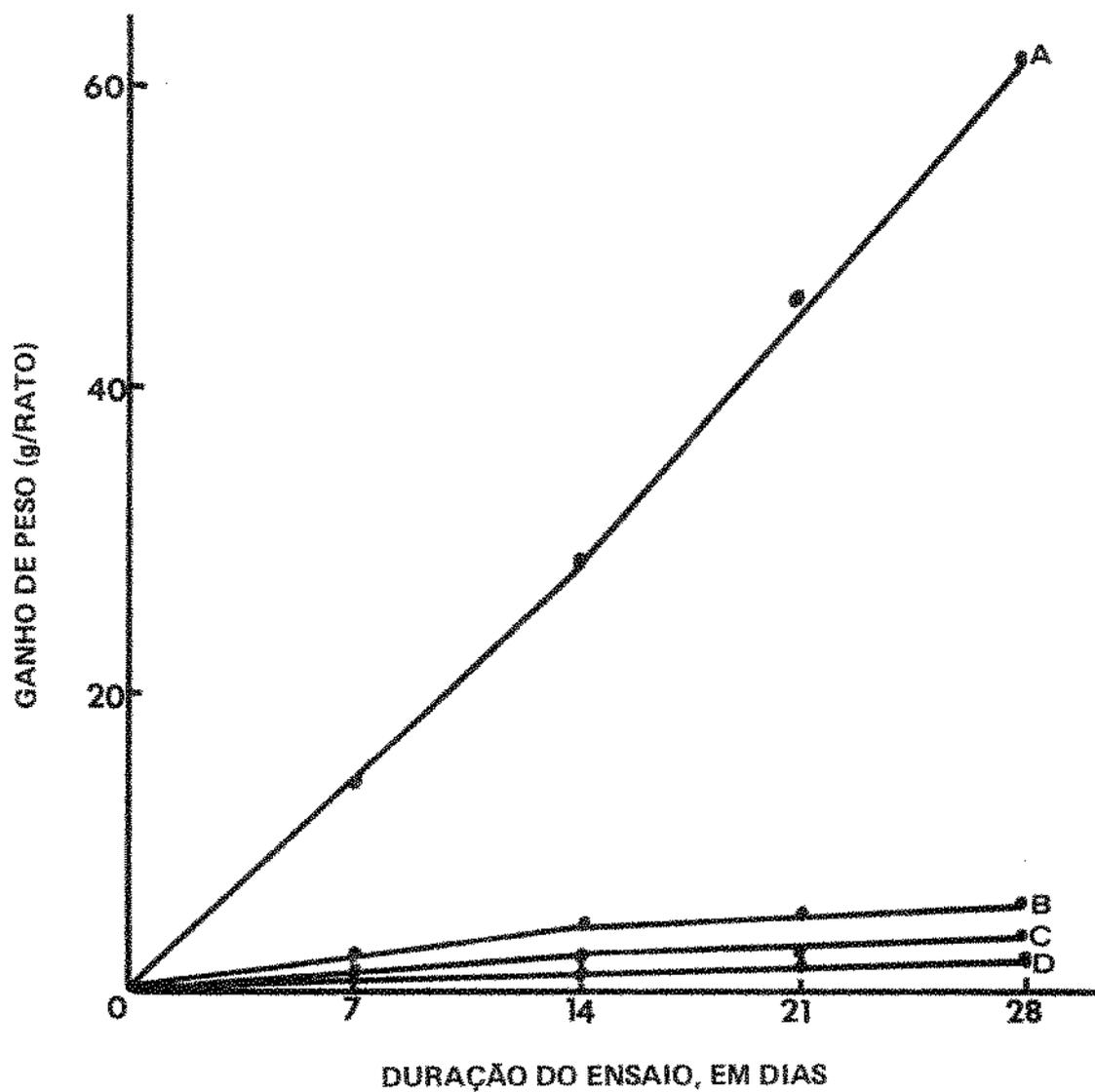


Fig. 6: Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 10) com o isolado total do feijão Rosinha G 2, autoclavado por tempos diferentes. A, caseína; B, C e D, isolado total dialisado (albuminas + globulinas) autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 7 1/2, 15 e 30 minutos, respectivamente.

Efeito do tratamento térmico no extrato aquoso sobre a atividade dos fatores antinutricionais

No Quadro 11, os resultados mostram que para os inibidores da tripsina e da quimotripsina o aquecimento do extrato aquoso em água fervente aumentou a atividade, chegando a 115 e 159%, respectivamente, logo aos 5 minutos de aquecimento. Depois de 2 horas de aquecimento, a atividade antitriptíptica era de 104% e a antiquimotriptíptica de 99%. Quando tratado em autoclave a 121°C por uma hora, o extrato aquoso ainda apresentava pequena atividade inibitória para ambos inibidores.

A hemaglutinina foi completamente inativada com apenas 5 minutos em água fervente.

Ainda não temos uma explicação plausível para esse fenômeno, uma vez que o aquecimento do grão inativou rapidamente esses inibidores, tornando-os insolúveis em água e de difícil extração, como comprovam os dados das Figuras 7 e 8.

Quadro 11: Efeito do tratamento térmico sobre a atividade dos fatores antinutricio-  
nais no extrato aquoso de feijão Rosinha G2

Aquecimento* (minutos)	Atividade do inibidor de tripsina (UTI/mgProt)**	Atividade re- sidual da an- titripsina %	Atividade do inibidor de quimotripsina (UQI/mgProt)**	Atividade da residual da antiquimotrip- sina %	Atividade da fito-he- maglutina (µgProt./ml)***
97°C					
0	161,3	100	41,8	100	0,49
5	185,5	115	66,4	159	(-)
15	183,9	114	65,6	157	(-)
30	183,9	114	49,3	118	(-)
60	182,3	113	46,4	111	(-)
120	167,7	104	41,4	99	(-)
121°C					
15	33,9	21	12,1	29	(-)
30	9,7	6	7,1	18	(-)
60	6,5	4	1,7	4	(-)

\*O extrato de feijão tratado termicamente continha 1mg de proteínas por mililitro.

\*\*Unidades de tripsina e quimotripsina inibidas por miligrama de proteínas.

\*\*\*Concentração mínima de proteínas necessária para promover hemaglutinação dos eri-  
trócitos.

(-) ausência de hemaglutinação.

Efeito do tratamento térmico no grão inteiro sobre a atividade dos fatores antinutricionais

Na Figura 7, podemos verificar a relação encontrada entre a inativação do fator antitripsina, da hemaglutinina e a perda da extratibilidade das proteínas em função do tempo de tratamento térmico dos grãos em água fervente. A inativação do fator antitripsina foi rápida, não sendo mais detectada atividade após 4 minutos de tratamento térmico a 97°C, enquanto que a hemaglutinina parece ser um pouco mais resistente, apresentando uma pequena atividade aos 7 minutos e nenhuma aos 10 minutos de aquecimento. Comprovação semelhante pode ser verificada na Figura 8 (foto) em que algumas bandas de proteínas desapareceram do extrato aquoso obtido dos grãos com maiores tempos de aquecimento, inclusive as bandas correspondentes aos inibidores de tripsina e de quimotripsina (I).

No extrato de feijão cru foi possível distinguir 10 bandas de proteínas, sendo que com o aumento do tratamento térmico, o número de bandas tornou-se menor, havendo ainda uma diminuição da mobilidade relativa das proteínas que passaram a se concentrar nas bandas de menor mobilidade no gel.

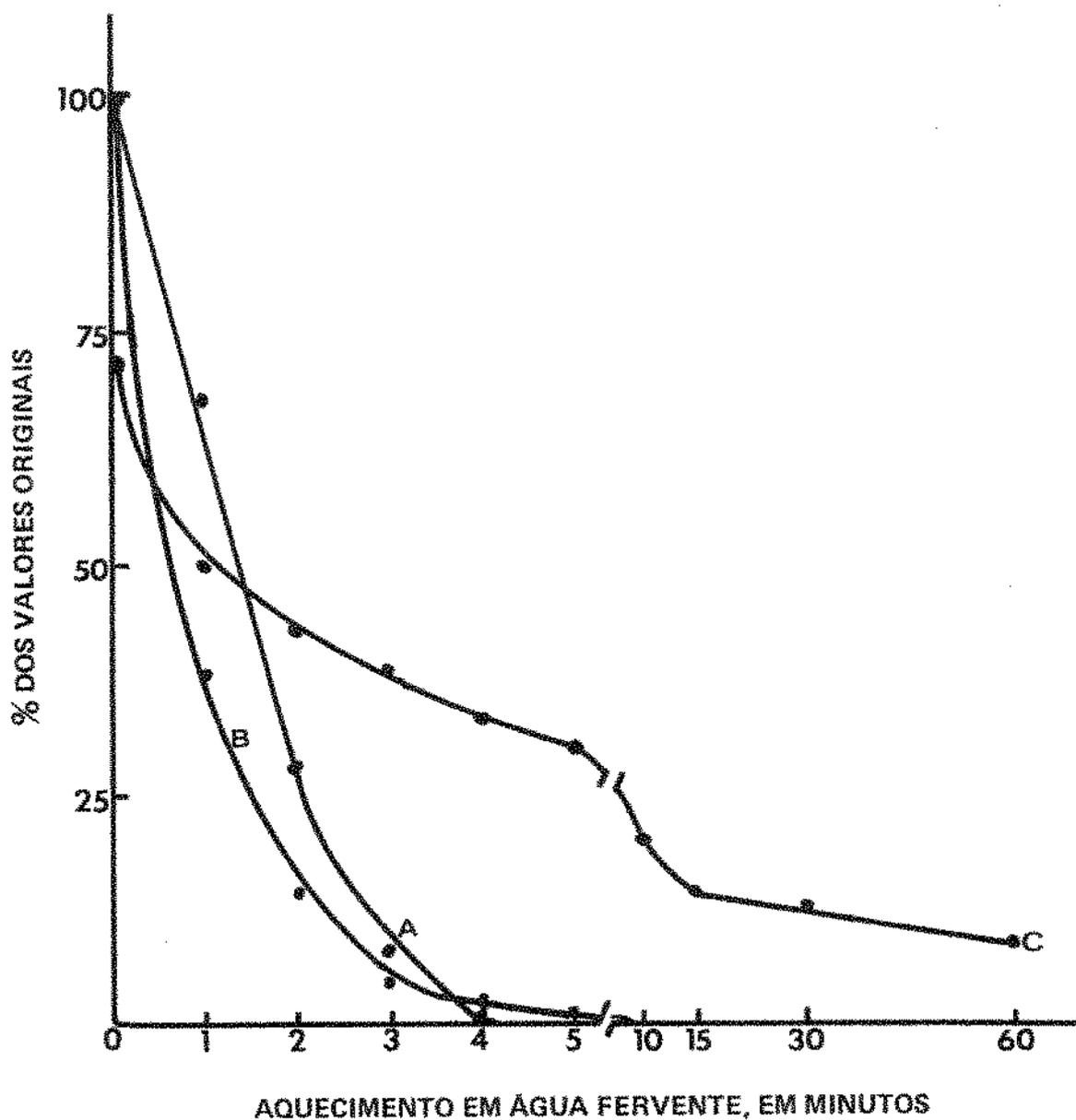
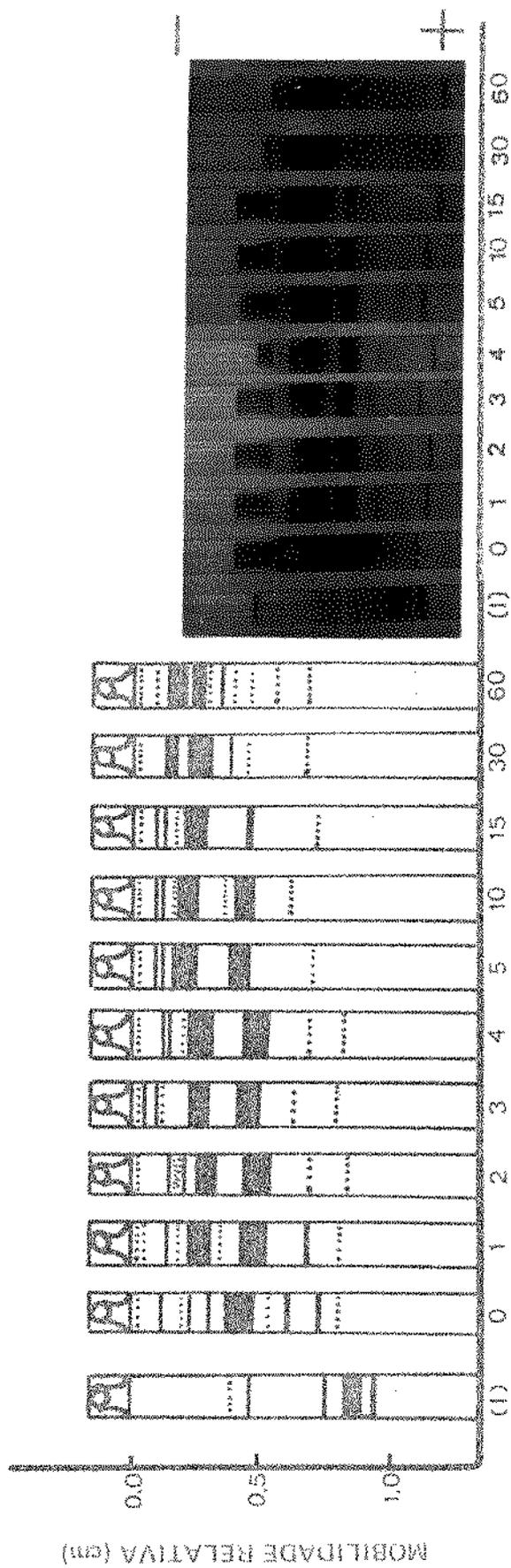


Fig. 7: Inativação térmica do fator antitripsina, da hemaglutinina e perda de solubilidade das proteínas do feijão Rosinha G 2, previamente macerado em água por doze horas. A, atividade residual do fator antitriptico; B, atividade residual da hemaglutinina; C, solubilidade das proteínas em água.



TEMPO DE AQUECIMENTO EM ÁGUA FERVENTE, EM MINUTOS

Fig. 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida simples com extratos de feijão Rosinha G 2 tratados termicamente em água fervente, por tempos diferentes. (1) Inibidor de tripsina purificado em coluna de Sephadex G-100. Intensidade das bandas: ....fraco, ———médio, —————forte.

Efeito das condições e tempo de estocagem sobre as propriedades físico-químicas, culinárias e nutricionais do feijão

Propriedades físico-químicas e culinárias

Nas Figuras 9, 10, 11 e 12, apresentam-se as determinações de alguns parâmetros físico-químicos e culinários do feijão estocado por 6 meses em 3 condições diferentes, quais sejam: a) câmara controlada a 12°C e 52% de umidade relativa (UR) do ar; b) condições ambientais de laboratório, 22-25°C e 65-70% de UR e c) estufa controlada a 37°C e 76% de UR. A cada 2 meses, durante a estocagem, foram retiradas amostras e feitas as determinações percentuais de hidratação, casca dura ("hardshell"), ou seja, grãos com casca impermeável a água, digestibilidade *in vitro*, solubilidade das proteínas em água e em solução a 2% de NaCl, bem como medida da textura pelo processo de extrusão no Instron e observação visual da cor. O tempo de cocção foi feito em amostras a cada 3 meses de estocagem.

Os resultados mostram que houve variação dos parâmetros estudados em função do tempo de estocagem, sendo, no entanto, mais acentuada nas amostras estocadas nas condições de temperatura e UR mais elevadas. A Figura 9, mostra que o grau de hidratação diminuiu na estocagem a 12°C de 90 para 80%, sendo a diminuição bem maior no feijão que ficou no ambiente de laboratório, de 90 para 42%, enquanto que aumentou no estoca-

do a 37°C de 90 para 109%. Na Figura 10, observa-se que a percentagem de casca dura ou impermeável permaneceu constante, 2% no estocado a 12°C, aumentando no estocado no ambiente de 2 para 66% e desaparecendo no estocado a 37°C. A Figura 11, mostra que a textura medida no Instron pelo processo de extrusão permaneceu praticamente constante, cerca de 260kg-força na célula extrusora, para os feijões estocados a 12°C e no ambiente, tendo aumentado para mais de 500kg-força (limite da escala do Instron), após 4 meses de estocagem a 37°C. A Figura 12, mostra que o tempo necessário para a cocção, sob pressão atmosférica normal, aumentou nas 3 condições de estocagem, passando de 60 para 95, 116 e mais de 240 minutos para os feijões estocados a 12°C, 22-25°C e 37°C, respectivamente. O feijão estocado a 37°C, mesmo após 240 minutos de cozimento, ainda permaneceu com textura rígida, contrastando com o feijão novo, que, após cozido, apresentou uma textura farinácea e macia.

Também foram estudados outros parâmetros, cujos efeitos das condições de estocagem não foram muito acentuados, sendo mencionados a seguir. A digestibilidade *in vitro* do feijão cru e cozido sofreu pequena redução nas 3 condições de estocagem, sendo a mais acentuada para o feijão estocado a 37°C por 6 meses. A solubilidade das proteínas em água e em solução a 2% de NaCl também diminuiu um pouco com o tempo de estocagem e aumento de temperatura e UR. A observação visual mostrou que a cor natural não mudou quando o feijão foi estocado a 12°C, mas escureceu progressivamente no feijão estocado no ambiente e muito mais naquele a 37°C.

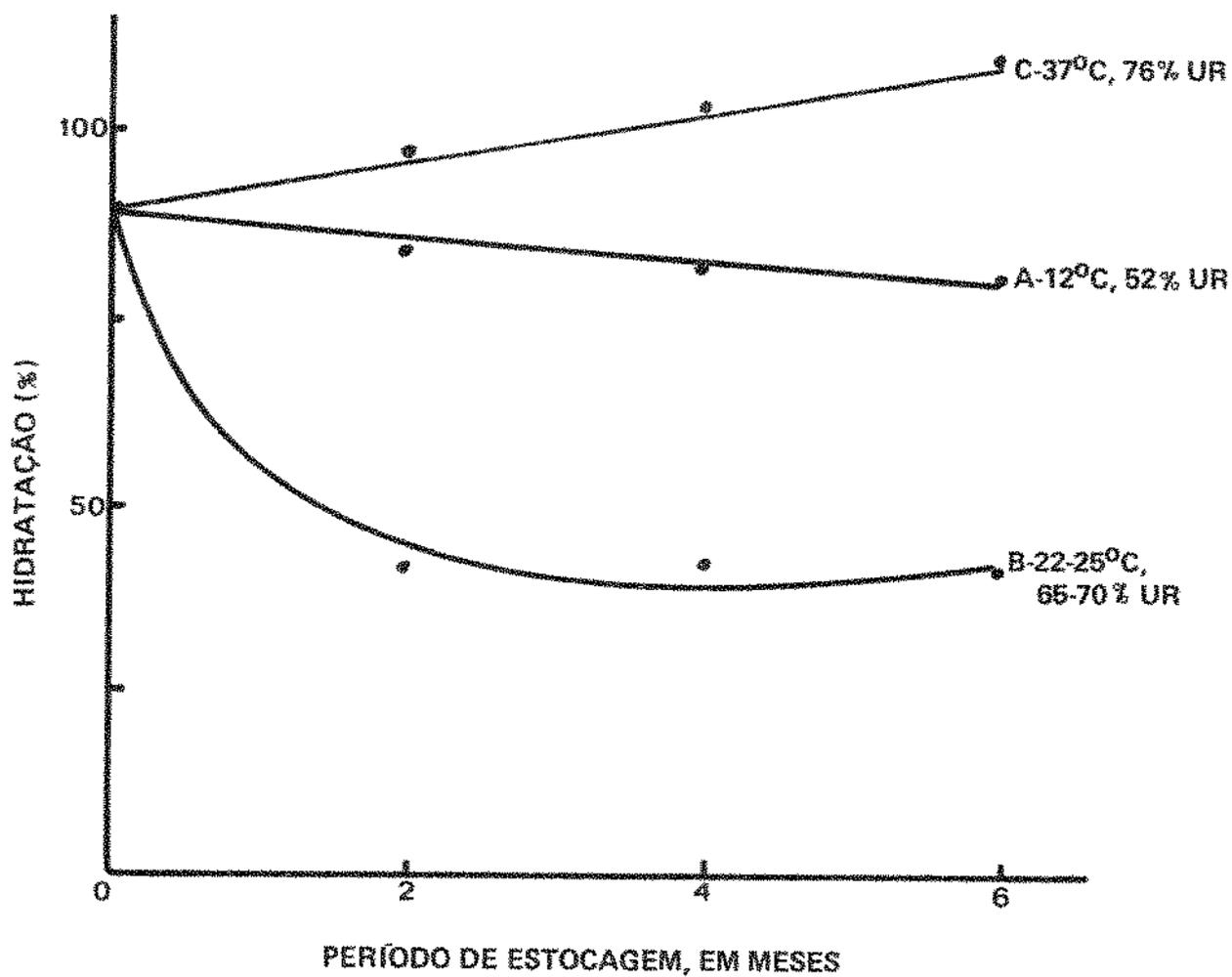


Fig. 9: Variação da capacidade de absorção de água do feijão Rosinha G 2 em função do tempo e condições de estocagem. Percentagem de hidratação no feijão macerado por seis horas à temperatura ambiente.

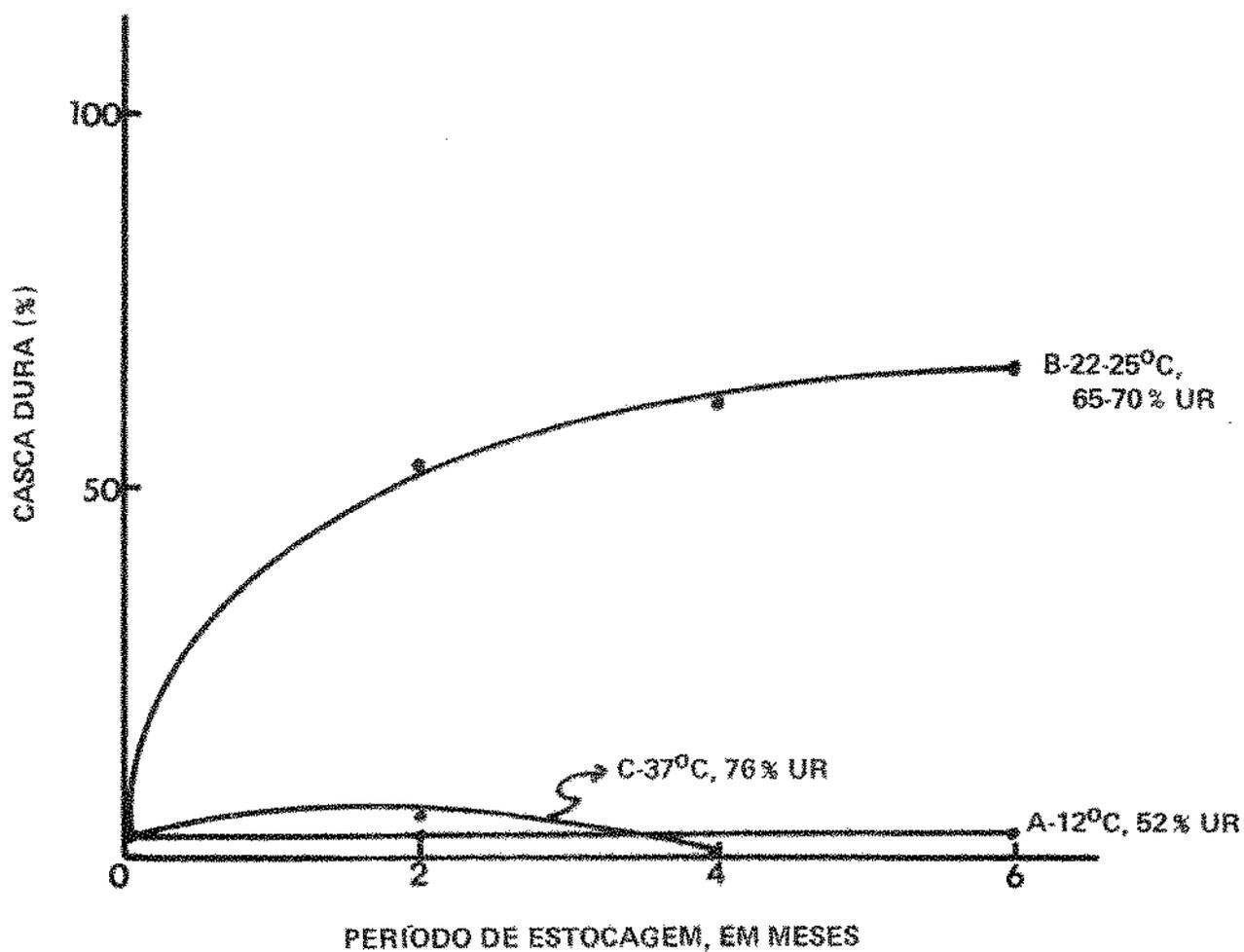


Fig. 10: Variação de casca dura do feijão Rosinha G 2 em função do tempo e condições de estocagem. Percentagem de casca impermeável após seis horas de maceração em água à temperatura ambiente.

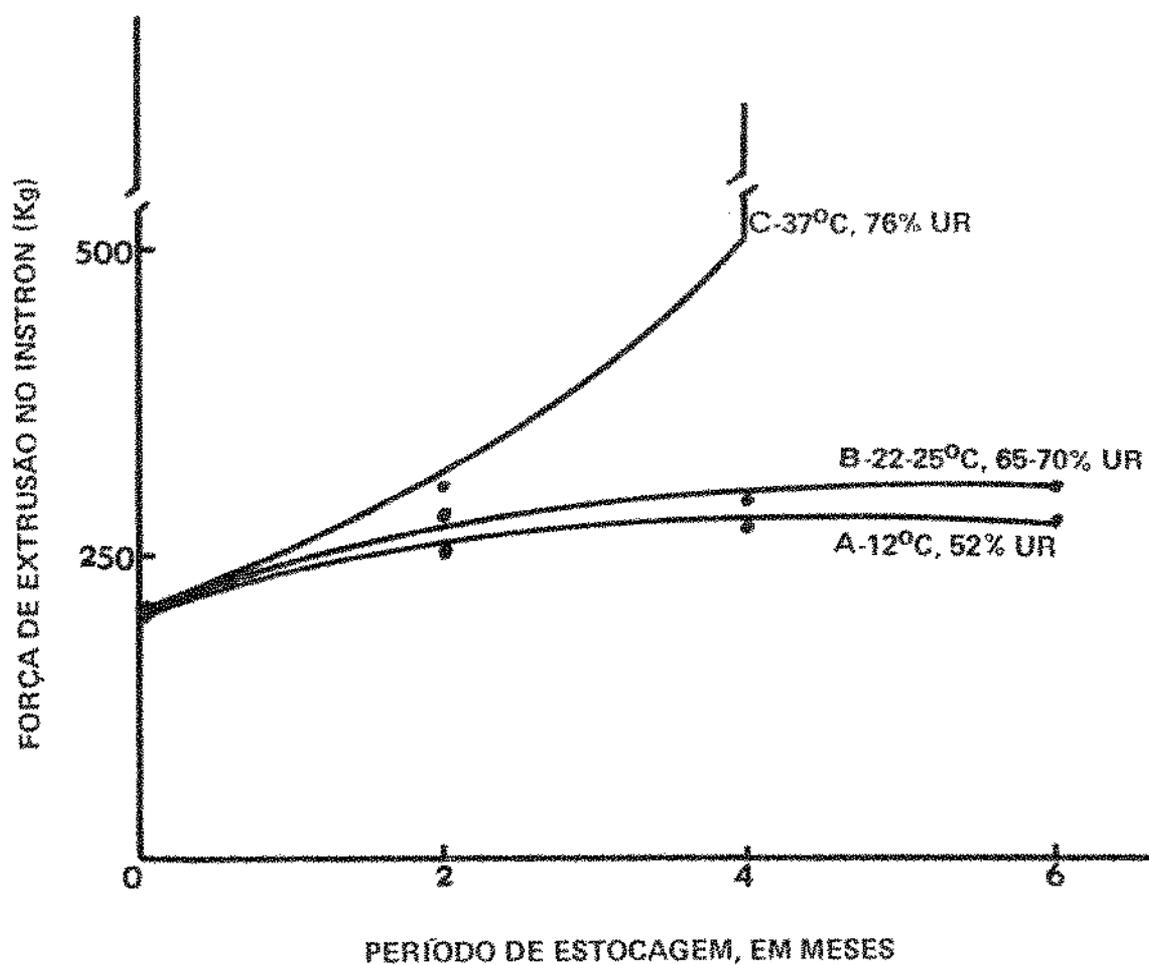


Fig. 11: Alteração da textura do feijão Rosinha G 2 em função do tempo e condições de estocagem. Textura medida pela força da extrusão no INSTRON: feijão macerado 12 horas e cozido 30 min. sob pressão atmosférica.

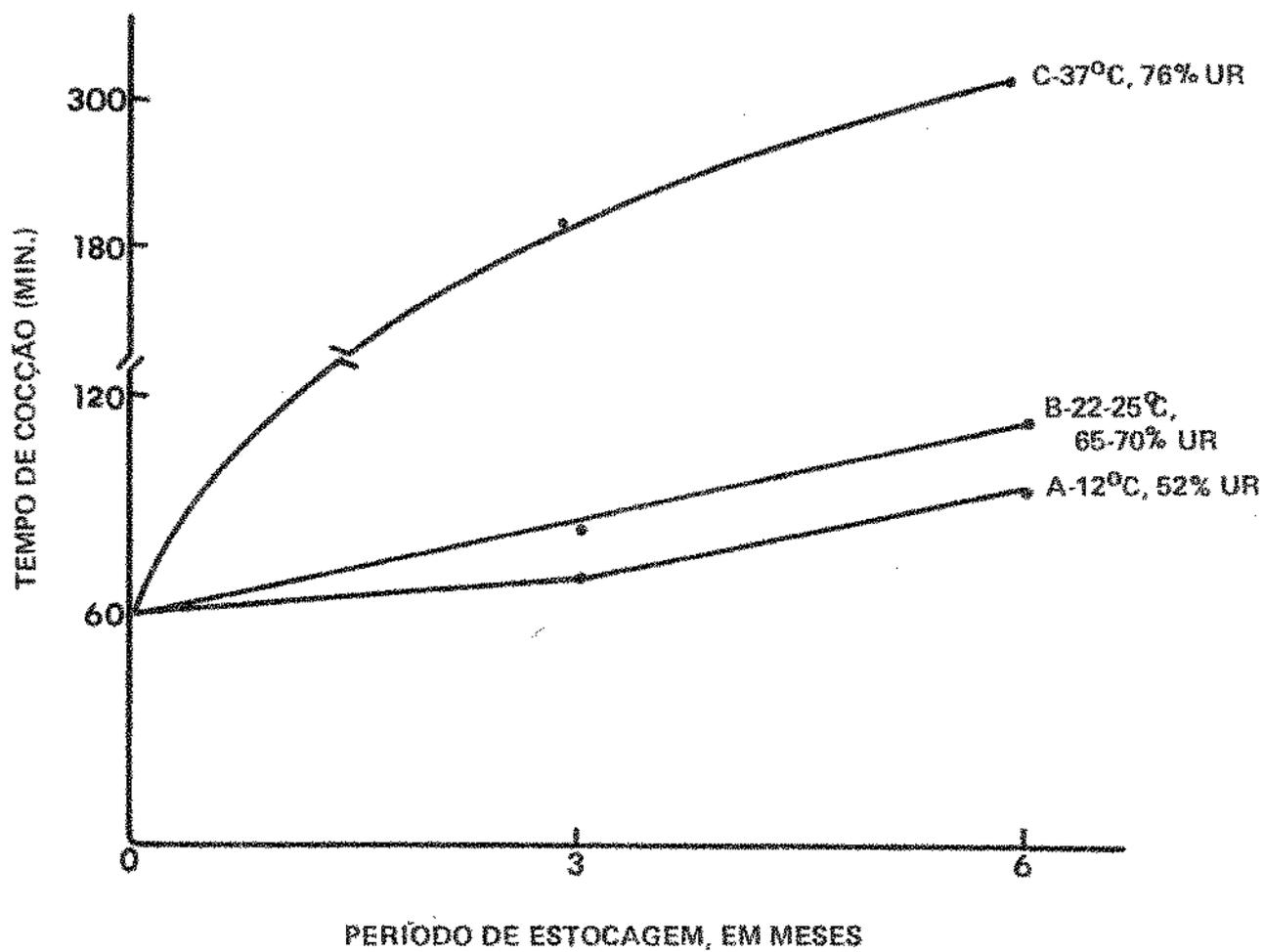


Fig. 12: Variação do tempo de cocção do feijão Rosinha G 2 em função do tempo e condições de estocagem. Feijão macerado por 12 horas e cozido sob pressão atmosférica.

### Propriedades nutricionais

No Quadro 12, apresentam-se os valores nutricionais encontrados no feijão estocado por 6 meses, em condições diferentes de temperatura e umidade relativa. Após a colheita, aos 3 e aos 6 meses de estocagem, foram feitas as determinações de PER, disponibilidade de metionina e cisteína e digestibilidade aparente *in vivo* das proteínas.

Os resultados evidenciam acentuada redução nos parâmetros estudados em função do tempo de estocagem e, especialmente, das condições mais elevadas de temperatura e umidade relativa. Os valores de PER decresceram de 1,01 após a colheita para 0,66, 0,43 e 0,10 nas amostras de feijão estocadas por 6 meses em câmara com temperatura controlada a 12°C e 52% de UR, ambiente de laboratório a 22-25°C e 65-70% de UR e em estufa a 37°C e 76% de UR, respectivamente. A disponibilidade biológica da metionina e da cisteína, bem como a digestibilidade aparente *in vivo* das proteínas, decresceram nas 3 condições de estocagem, sendo que o maior decréscimo foi para o feijão estocado em estufa a 37°C e 76% de UR. Esses valores após a colheita foram de 46,3, 51,6 e 62,4%, que decresceram para 27,6, 30,1 e 54,5%, respectivamente, para a disponibilidade de metionina e cisteína e para a digestibilidade das proteínas no final de 6 meses de estocagem.

Os resultados mostram que a estocagem não conservou as qualidades nutricionais do feijão e que quanto maior foi a temperatura, a umidade relativa e o tempo de estocagem, maiores foram as perdas das qualidades nutricionais e culinárias.

Quadro 12: Efeito do tempo e das condições de estocagem sobre as propriedades nutricionais das proteínas do feijão Rosinha G2

Determinações	Condições e tempo de estocagem, em meses						
	Início	12°C, 52%UR		22-25°C, 65-70%UR		37°C, 76%UR	
		3	6	3	6	3	6
PER*	1,01a	0,98b	0,66c	0,75d	0,43e	0,21f	0,10g
Digestibilidade <i>in vivo</i> (%)	62,4	62,4	58,9	61,9	57,1	59,7	54,4
Metionina disponível (%)	46,3	44,7	43,1	41,5	38,2	36,6	27,6
Cisteína disponível (%)	51,6	47,7	45,8	45,8	43,0	42,0	30,1

\* Os valores do desvio padrão do PER foram: a)  $\pm 0,248$ ; b)  $\pm 0,264$ ; c)  $\pm 0,235$ ; d)  $\pm 0,236$ ; e)  $\pm 0,283$ ;

f)  $\pm 0,214$  e g)  $\pm 0,210$ . Neste ensaio encontrou-se para a caseína PER 3,36 $\pm$ 0,265.

Efeito da adição de metionina ao feijão integral e às diversas frações

Adição ao feijão com diferentes tempos de estocagem

No Quadro 13, encontram-se os valores de variação de peso e consumo de dieta por rato e por dia, PER, bem como digestibilidade aparente *in vivo* das proteínas do feijão, logo após a colheita, com 10 e 18 meses de estocagem em condições normais de prateleira (ambiente do laboratório, com cerca de 30°C e 70% de UR). Também são apresentados dados do mesmo feijão enriquecido com 3% de metionina e 2% de cisteína em relação à proteína. Utilizou-se dietas com 10% de proteínas de feijão e caseína na dieta padrão.

Os resultados mostram que o tempo de estocagem influenciou drasticamente no valor biológico das proteínas do feijão. As condições de estocagem não foram muito drásticas, cerca de 30°C, mas suficientes para reduzir de modo significativo as qualidades nutricionais das proteínas. Logo após a colheita, o PER foi de 1,27, valor esse que caiu para -0,29 e -0,45, respectivamente aos 10 e 18 meses de estocagem. O enriquecimento com metionina e cisteína elevou o PER para 2,45, 2,40 e 2,46 nos 3 períodos de estocagem. Isso representa uma elevação de quase 100% do valor do PER do feijão logo após a colheita e uma elevação muito maior em relação às amostras estocadas por 10 e 18 meses, muito embora o ganho de peso por

rato e por dia tivesse sido menor com as amostras estocadas , isto é, 1,96 no início, contra 1,65 e 1,13, após 10 e 18 meses de estocagem, respectivamente. A digestibilidade aparente *in vivo* não mudou quase nada em função do tempo de estocagem ou do enriquecimento.

Na Figura 13, estão representadas as curvas de crescimento médio dos ratos utilizados nos ensaios de PER correspondentes ao Quadro 13.

Quadro 13: Efeito do tempo de estocagem e da complementação com metionina sobre o valor biológico das proteínas do feijão Rosinha C2\*

Meses após colheita**	Variação de peso (g/rato/dia)		Ingestão de dieta (g/rato/dia)		PER±DP		Digestibilidade <i>in vivo</i> (%)	
	s/met.	c/met.	s/met.	c/met.	s/met.	c/met.	s/met.	c/met.
0	0,82	1,96	6,21	7,72	1,27±0,27	2,45±0,24	61,10	62,23
10	-0,12	1,65	4,32	7,63	-0,29±0,26	2,40±0,20	58,91	59,62
18	-0,17	1,13	4,10	5,00	-0,45±0,39	2,46±0,22	61,22	60,51
Caseína	2,49		7,87		3,36±0,27		93,37	

\*Ratos recém-desmamados, da linhagem "Wistar", mantidos em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*, por 28 dias.

\*\*Feijão estocado em ambientes de laboratório, autoclavado por 15 minutos a 121°C e dietas preparadas sem e com adição de 3% de metionina e 2% de cisteína em relação à proteína.

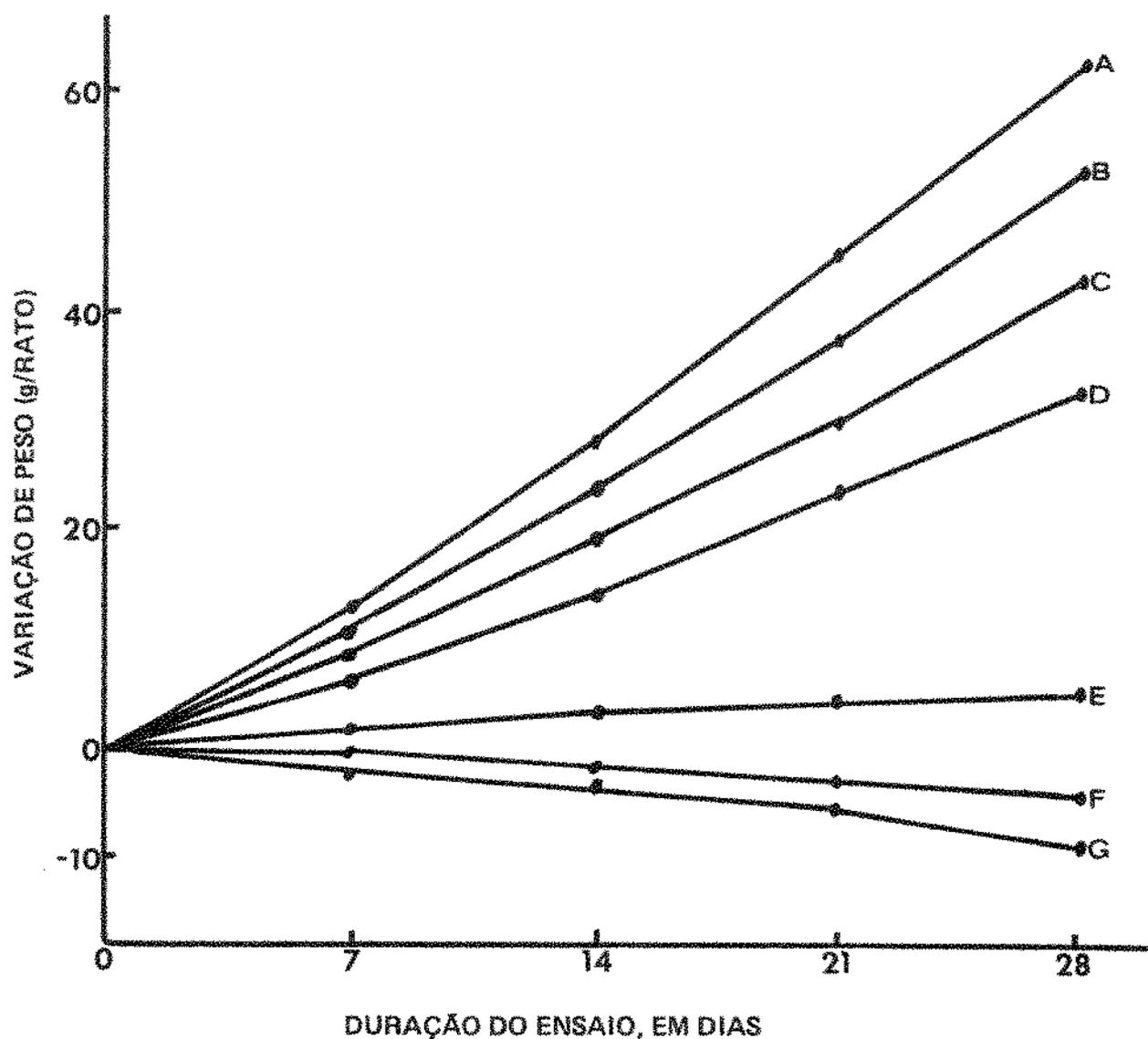


Fig. 13: Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos de PER (Quadro 13) relativos ao tempo de estocagem e enriquecimento com metionina e cisteína do feijão Rosinha G 2. A, caseína; E, F e G, dietas de feijão estocado 0, 10 e 18 meses, respectivamente; B, C e D, mesmos feijões enriquecidos com 3% de metionina e 2% de cisteína em base da proteína da dieta.

### Adição ao feijão integral e às frações isoladas

No Quadro 14, apresentam-se os valores de aumento de peso e consumo de ração por rato e por dia, PER e digestibilidade aparente *in vivo* das proteínas da farinha integral e das frações protéicas do feijão. As amostras foram autoclavadas por 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos a 121°C e testadas biologicamente sem e com adição de 3% de metionina e 2% de cisteína em relação à proteína.

A análise dos resultados evidencia o grande aumento no valor de PER e aumento de peso dos ratos submetidos às dietas enriquecidas. Esses valores foram mais altos do que o próprio padrão de caseína, sendo apenas a farinha integral a que apresentou tais valores inferiores aos da caseína. A digestibilidade não melhorou com o enriquecimento, em nenhum dos casos. Não houve também aumento de consumo da dieta.

Na Figura 14, apresentam-se as curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios de PER, Quadro 14. Pode-se facilmente notar que a melhoria no crescimento dos ratos foi superior, com exceção da dieta com farinha integral, à da própria dieta padrão de caseína.

Quadro 14: Efeito da complementação com metionina sobre o valor nutricional das proteínas do feijão Rosinha G2 integral e das suas frações protéicas isoladas\*

Fonte de proteínas nas dietas**	Ganho de peso (g/rato/dia)		Ingestão de dieta (g/rato/dia)		PER±DP		Digestibilidade <i>in vivo</i> (%)	
	s/met	c/met	s/met	c/met	s/met	c/met	s/met	c/met
Farinha integral	0,82	1,96	6,10	7,76	0,60±0,27	2,45±0,24	61,11	62,22
Fração albumina	0,25	2,84	3,93	8,05	0,72±0,22	4,01±0,23	81,82	83,10
Fração globulina	0,23	3,09	4,00	7,66	0,59±0,31	4,28±0,25	85,25	86,89
Isolado protéico total	0,24	3,10	4,05	8,20	0,68±0,28	4,40±0,33	85,42	86,36
Caseína	2,49		7,87		3,36±0,27		93,37	

\*Ratos da linhagem "Wistar", alimentados individualmente por 28 dias com água e comida *ad libitum*.

\*\*Farinha de feijão e suas frações protéicas autoclavadas por 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos a 121°C, sendo as dietas preparadas com 3% de metionina e 2% de cisteína em relação à proteína.

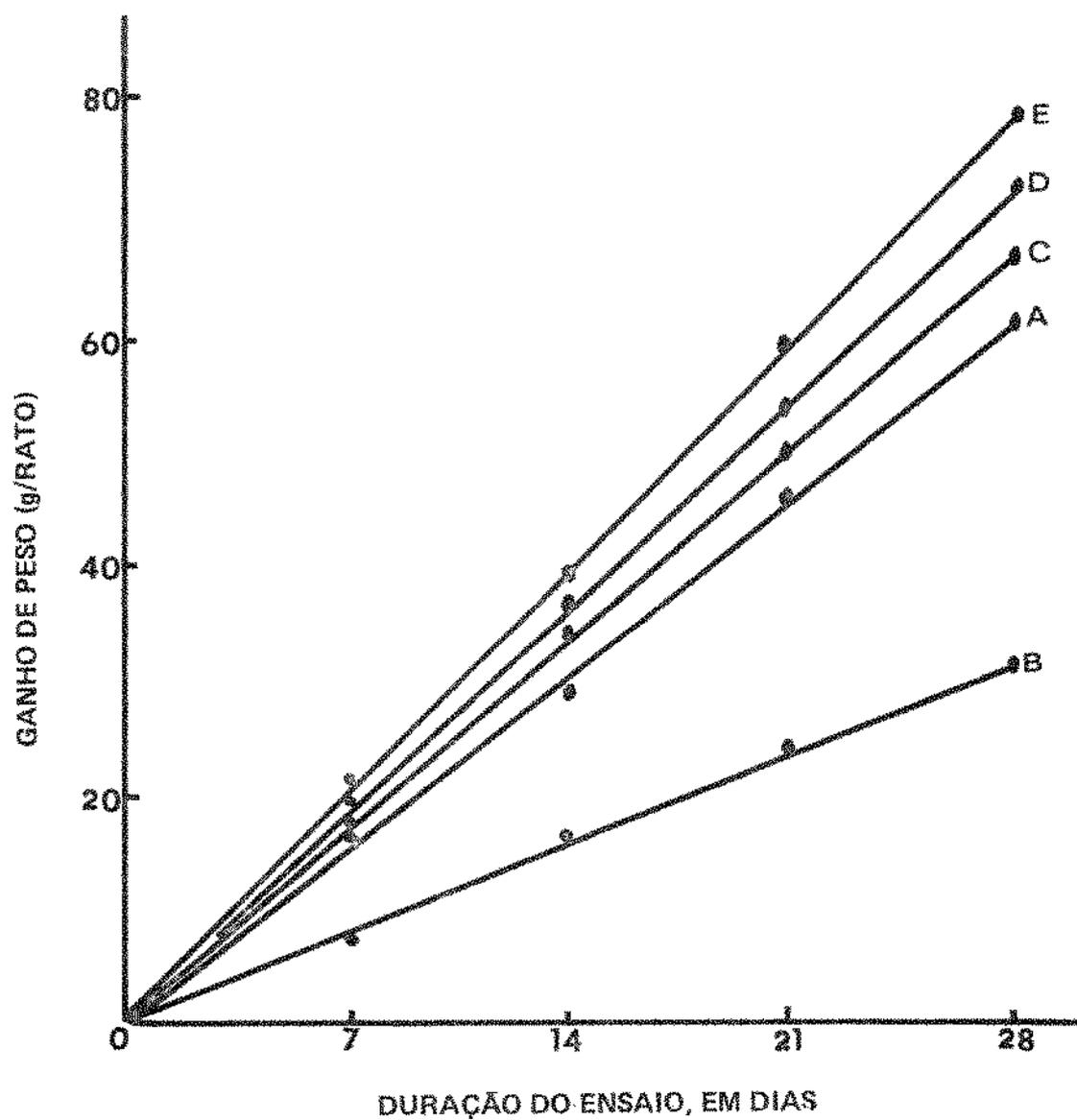


Fig. 14: Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios de PER (Quadro 14) com farinha integral de feijão Rosinha G 2 e suas frações protéicas, autoclavadas e enriquecidas com metionina. A, caseína; B, C, D e E, feijão integral, albumina, globulina, isolado total, autoclavados a 121°C por 7 1/2 minutos.

Estudo da incorporação de metionina no feijão em grão pelo processo de maceração

Efeito do tempo, temperatura e concentração de metionina

Nas Figuras 15, 16 e 17, apresentam-se as curvas referentes aos valores de retenção de metionina no feijão, em função do tempo, temperatura e concentração de metionina na solução de maceração.

Na Figura 15, pode-se observar que a maceração em solução a 3% (limite de solubilidade a 25°C) de metionina e temperatura ambiente, levou 10 horas para o máximo de retenção, 16g de metionina/100g de proteína de feijão, decrescendo com tempos mais longos de maceração. Nesse período de 10 horas de maceração, o feijão absorveu mais do que 100% de água, dificultando a secagem posterior, além de depreciar um pouco as características de aparência do feijão depois de seco.

Na Figura 16, observa-se a maceração em solução a 5% (limite de solubilidade a 50°C) de metionina e temperatura de 50°C. Nessas condições, o período de 1 hora já foi suficiente para atingir o máximo de retenção de metionina pelo feijão, 24g/100g de proteínas. Esse procedimento foi muito conveniente, pois os grãos, no fim de 1 hora, absorveram cerca de 40% de água, o que facilitou a secagem posterior, além de conservar as características de melhor aparência do produto comparadas com as do processo anterior.

Na Figura 17, manteve-se o tempo de 1 hora e a temperatura de 50°C constantes, tendo-se variado a concentração de metionina na solução de maceração. Os resultados confirmam que a maior absorção se deu com a maior concentração de metionina, isto é, 5% de metionina, que é o limite de solubilidade desse aminoácido a 50°C.

A análise dos dados das Figuras 15, 16 e 17, mostra que a melhor condição para incorporar metionina ao feijão em grãos por maceração foi aquela em que o mesmo permaneceu em solução a 5% de metionina à temperatura de 50°C durante 1 hora. Sob o aspecto comercial, é prático porque torna mais fácil a secagem e o produto final com 24g de metionina/100g de proteínas de feijão permitiu uma mistura com feijão testemunha, na proporção de 1:7, dando ainda um produto final com mais de 3g de metionina/16g N. Com esse procedimento, o teor de metionina do feijão foi igual ao da caseína, sem alterar as características de aparência e melhorando consideravelmente o valor nutricional do produto, como ficou evidenciado pelos dados do Quadro 16.

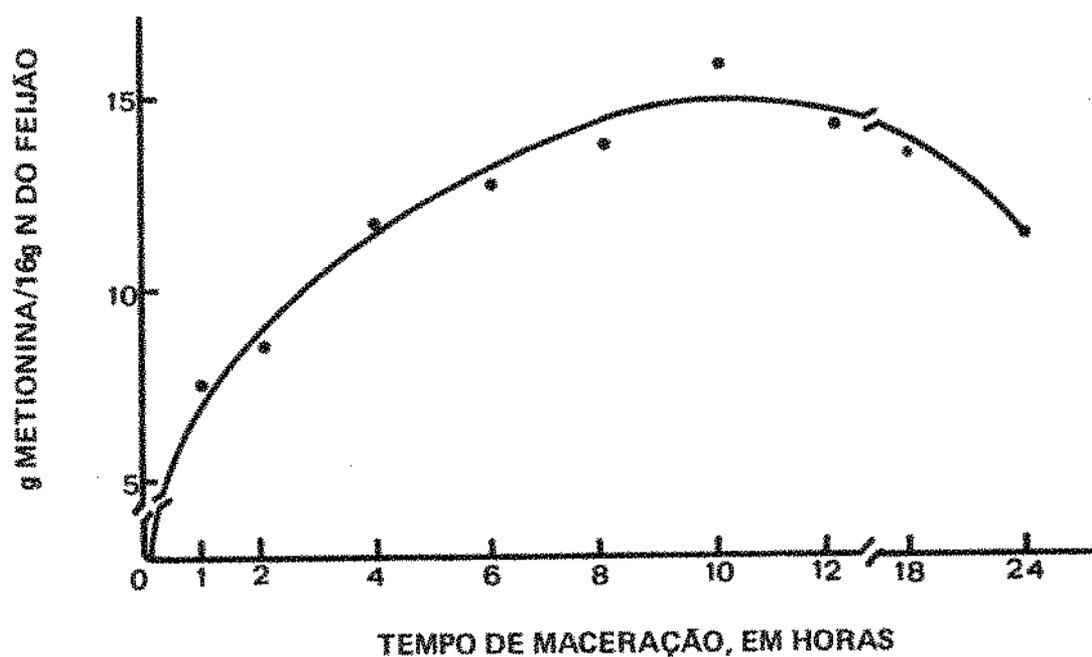


Fig. 15: Curva de retenção de metionina no feijão Rosinha G-2 em função do tempo de maceração em solução a 3% de metionina e temperatura ambiente.

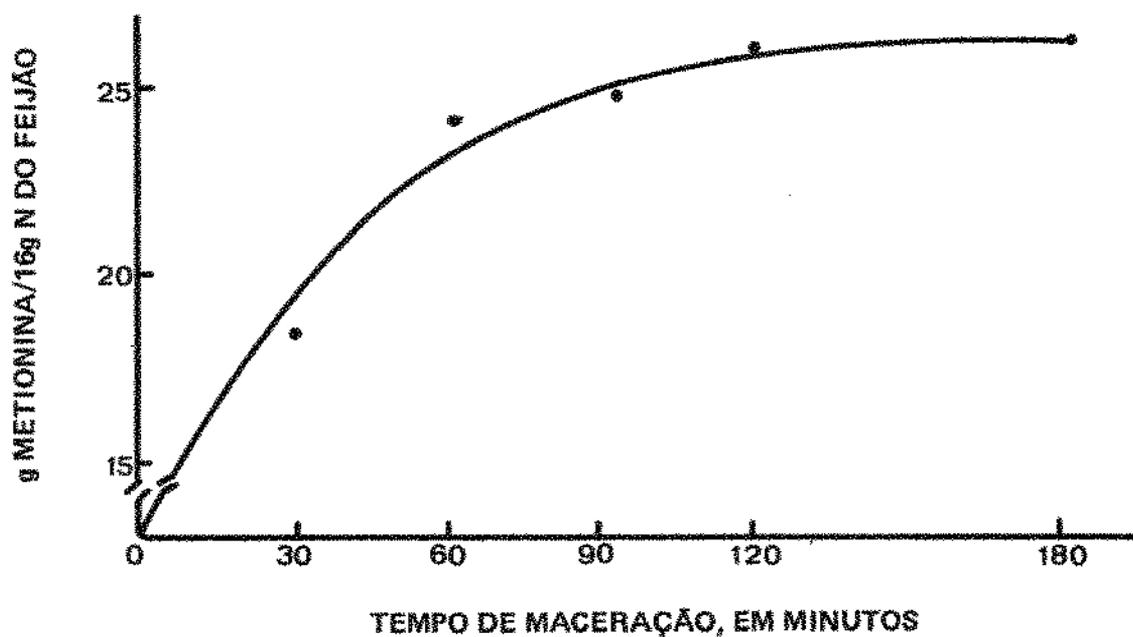


Fig. 16: Curva de retenção de metionina no feijão Rosinha G 2 em função do tempo de maceração em solução a 5% de metionina e temperatura de 50°C.

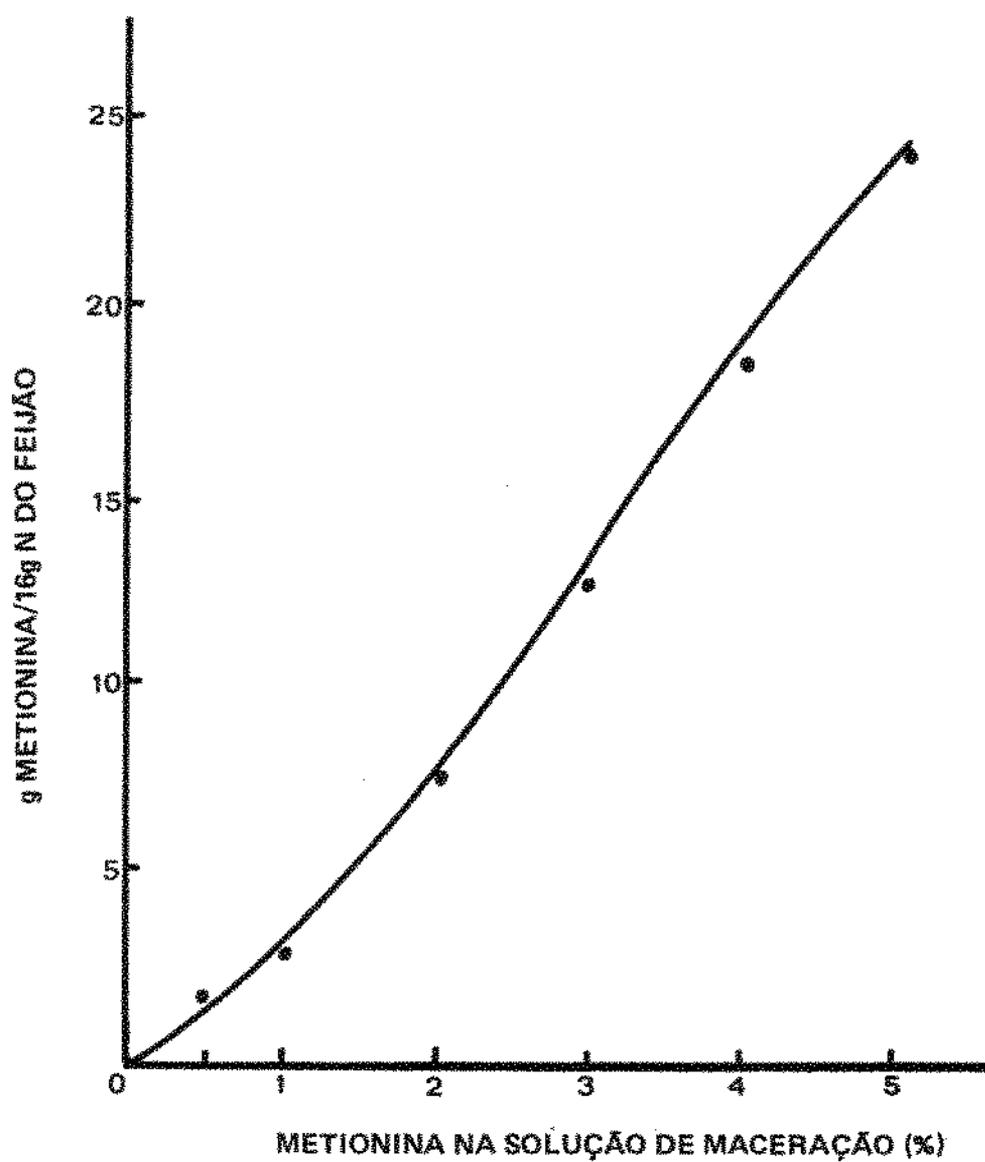


Fig. 17: Curva de retenção de metionina no feijão Rosinha G 2 em função da concentração de metionina na solução de maceração durante uma hora a 50°C.

### Metionina incorporada ao feijão por maceração

No Quadro 15, os resultados indicam que o feijão macerado em soluções de metionina pode ser utilizado para elevar os teores deste aminoácido para valores próximos aos da caseína, isto é, 3,15g de metionina por 16g de nitrogênio.

Quando o feijão foi cozido sem a água de maceração, houve uma redução da metionina de 3,24 para 2,13, mostrando haver grande perda na água de maceração. Com isso, fica evidenciado que não é conveniente eliminar a água de maceração quando esta for feita antes do cozimento do feijão que tenha sido enriquecido com metionina pelo processo de maceração. O feijão macerado em solução a 5% de metionina atingiu um teor deste aminoácido acima de 24g/16g N, uma vez que a mistura na proporção de 1:7 com feijão testemunha ainda continha 3,02g/16g N, mostrando a grande vantagem desse procedimento sob o aspecto de processamento industrial.

Quadro 15: Concentração de metionina em amostras de feijão Rosinha G2 antes e após enriquecimento por maceração

Tratamento das amostras de feijão*	Metionina (g/16g N)**
Testemunha, cozido sem água de maceração	0,85
Macerado em solução a 1% de metionina, cozido sem a água de maceração	2,13
Macerado em solução a 1% de metionina, cozido com a água de maceração	3,24
Macerado em solução a 5% de metionina, misturado na proporção de 1:7 com feijão testemunha, cozido sem a água de maceração	1,98
Macerado em solução a 5% de metionina, misturado na proporção de 1:7 com o feijão <u>testemu</u> nha, cozido com a água de maceração	3,02
Dieta padrão preparada com a caseína	3,15

\* Amostras utilizadas no preparo das dietas do Quadro 16.

\*\*Valores encontrados pelo método colorimétrico de Lunder, 1973.

Avaliação nutricional das proteínas do feijão enriquecido com metionina pelo processo de maceração

No Quadro 16, estão os resultados dos ensaios biológicos efetuados com amostras de feijão que foram maceradas em soluções a 1% e a 5% de metionina por 1 hora a 50°C e secadas ao sol. O feijão macerado em solução a 5% de metionina foi misturado com feijão testemunha na proporção de 1:7. Essas amostras foram maceradas em água por 12 horas e submetidas ao cozimento por 1 hora a pressão atmosférica, sendo num caso cozidas na água de maceração e no outro cozidas após substituir essa água por água destilada. A seguir, foram liofilizadas e moídas em moinho de martelo.

Os resultados mostram que a maceração com soluções de metionina elevou o PER de 0,85 para cerca de 2,5 em qualquer dos casos, quando o cozimento foi com a água de maceração. Quando a água de maceração foi desprezada antes do cozimento, os valores de PER baixaram para 1,6 e 1,3, o que mostra que boa parte da metionina foi eliminada com a água de maceração.

O aumento de peso corporal dos ratos, bem como a eficiência das dietas, também responderam favoravelmente à incorporação de metionina na maceração, sendo um pouco mais baixos quando o cozimento foi sem a água de maceração.

Na Figura 18, apresentam-se as curvas de crescimento médio dos ratos utilizados nos ensaios biológicos (PER) correspondentes ao Quadro 16, pode-se verificar que o crescimen-

to não alcançou o da caseína em nenhuma das amostras, mas melhorou consideravelmente quando o feijão foi enriquecido com metionina pelo processo de maceração.

Quadro 16: Avaliação nutricional das proteínas do feijão Rosinha C2, antes e após enriquecimento com metionina pelo processo de maceração\*

Tratamento das amostras de feijão utilizadas nas dietas**	Ganho de peso (g/rato/dia)	Ingestão de dieta (g/rato/dia)	PER:DP	Eficiência das dietas %
Testemunha, cozido sem a água de maceração	0,57	6,07	0,85±0,28	9,40
Macerado em solução a 1% de metionina, cozido sem a água de maceração	1,24	6,75	1,60±0,29	18,39
Macerado em solução a 1% de metionina, cozido com a água de maceração	2,11	7,93	2,57±0,23	26,57
Macerado em solução a 5% de metionina, misturado com feijão testemunha na proporção de 1:7, cozido sem a água de maceração	1,02	7,02	1,29±0,22	14,58
Macerado em solução a 5% de metionina, misturado com feijão testemunha na proporção de 1:7, cozido com a água de maceração	2,14	8,76	2,44±0,26	24,47
Dieta padrão com caseína	2,49	7,87	3,36±0,27	31,58

\*Ratos recém-desmamados, da linhagem "Wistar", mantidos em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*, por 28 dias.

\*\*As amostras de feijão foram maceradas em soluções a 1% e a 5% de metionina por 1 hora a 50°C e secadas ao sol. O feijão macerado em solução a 5% de metionina foi misturado na proporção de 1:7 com feijão testemunha. A seguir, as amostras foram maceradas em água por 12 horas, cozidas sob pressão atmosférica por 1 hora, com e sem essa água de maceração, liofilizadas e moídas.

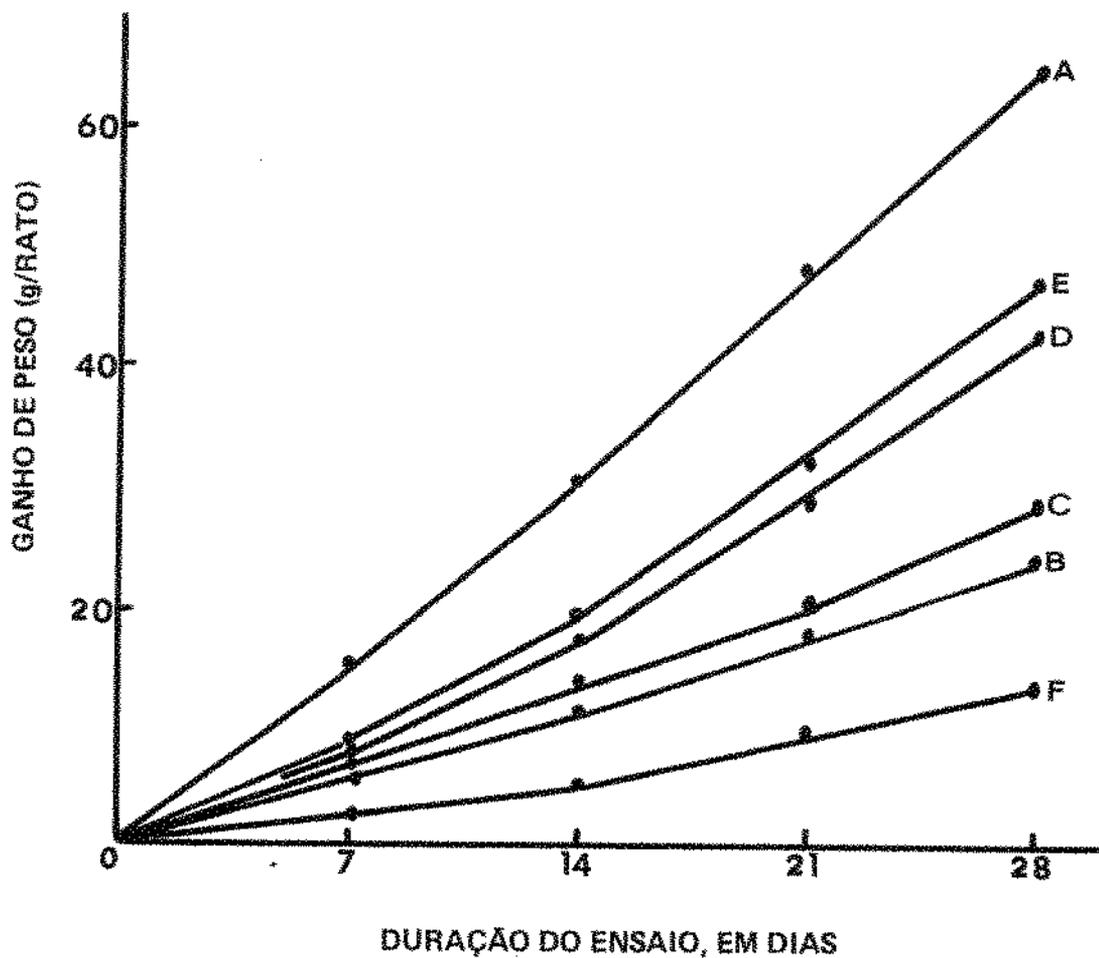


Fig. 18: Curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios de PER (Quadro 16) no estudo com feijão Rosinha G 2 enriquecido em solução de metionina. A, caseína; D e C, solução a 1% de metionina com e sem água de maceração, respectivamente; E e B, solução a 5% de metionina, com e sem água de maceração, respectivamente; F, feijão não enriquecido, sem a água de maceração.

### Disponibilidade biológica da metionina

No Quadro 17, apresentam-se os dados de disponibilidade biológica da metionina no feijão testemunha e no macerado em solução a 5% de metionina e misturado com feijão testemunha na proporção de 1:7.

Essas amostras foram maceradas por 12 horas em água destilada e na temperatura ambiente, seguindo-se cozimento na mesma água, por 1 hora a pressão atmosférica, liofilização e moagem. As percentagens de disponibilidade biológica da metionina, determinadas pelo balanço da absorção do feijão testemunha e do macerado foram 55,8% e 83%, respectivamente. A melhoria na disponibilidade da metionina do feijão macerado resultou a absorção de 100% da metionina que foi incorporada ao feijão pelo processo de maceração. Essa verificação foi feita por cálculo a partir dos valores de ingestão e excreção da metionina pelos ratos submetidos às respectivas dietas, conforme apresentado no Quadro 17. A disponibilidade da metionina incorporada por maceração foi de 103%, o que pode ser atribuído a uma superestimação dos resultados, ou então ter havido uma melhoria na utilização da metionina do próprio feijão, motivada pela presença da metionina de fonte sintética.

O fato da metionina incorporada ao feijão pela maceração permanecer totalmente disponível, constitui mais uma evidência da praticabilidade do processo, sempre que o enriquecimento com esse aminoácido se fizer necessário ou se mostrar vantajoso.

Quadro 17: Disponibilidade biológica da metionina incorporada ao feijão Rosinha G2 por maceração\*

Metionina**	Dietas com feijão***	
	Testemunha	Macerado
Ingerida (mg)	103,45	397,51
Incorporada (mg)		272,63
Excretada nas fezes (mg)	45,71	67,20
Absorvida (mg)	57,74	330,31
Disponível (%)	55,78	83,09
Incorporada disponível (%)		103,00
Dieta ingerida (g)	111,00	134,00

\*Ratos da linhagem "Wistar", mantidos em gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum*, por 10 dias.

\*\*Metionina total determinada pelo método de Lunder, 1973.

\*\*\*Dietas preparadas com feijão testemunha e macerado em solução a 5% de metionina, misturado na proporção de 1:7 com feijão testemunha, cozidos por 1 hora, sob pressão atmosférica com a água de maceração.

Avaliação sensorial do feijão testemunha e enriquecido por ma  
ceração

Análise de preferência pelo método Psicofísico de Comparação  
Pareada Direcional

No Quadro 18, observam-se os resultados da análise sensorial de preferência do feijão em grãos macerado com soluções a 1% e a 5% de metionina. Os resultados indicam que o tratamento A (feijão testemunha) não diferiu de B (feijão macerado em solução a 1% de metionina) e nem de C (feijão macerado em solução a 5% de metionina e misturado na proporção de 1:7 com o testemunha), ao nível de significância estatística de 5%, nas condições do experimento.

Análise de preferência pelo método de Escala Não-Estruturada

Os resultados do Quadro 19, mostram a preferência para odor e gosto do feijão macerado em solução a 5% de metionina. A análise estatística indica que tanto para o odor quanto para o gosto o tratamento A (testemunha) diferiu de B (feijão macerado em solução a 5% de metionina, lavado e misturado na proporção de 1:4 com testemunha) e de C (feijão macerado em solução a 5% de metionina e misturado na proporção de 1:7 com testemunha) ao nível de significância estatística de 5%, quando o feijão foi cozido sem tempero. O tratamento A alcançou maior média, portanto maior preferência em relação ao odor e gosto, usando-se o teste de Dunnett, 1955, para significância estatística entre o testemunha e os tratamentos. O tratamento

B não diferiu de C ao nível de probabilidade de 5%.

Quando o feijão foi cozido com tempero, a análise de variância da preferência quanto ao odor e gosto mostrou não haver diferença estatística ao nível de 5% entre o testemunha e os tratamentos B e C, quer para o odor ou para o gosto.

Quadro 18: Preferência para feijão Rosinha G2 macerado em solução de metionina, usando-se o método Psicofísico de Comparação Pareada Direcional, dada em frequência (N=40)<sup>1</sup>

Repetições	Comparação entre amostras					
	A	x	B	A	x	C
I	9		1*	6		4 <sup>ns</sup>
II	5		5 <sup>ns</sup>	4		6 <sup>ns</sup>
III	5		5 <sup>ns</sup>	5		5 <sup>ns</sup>
IV	5		5 <sup>ns</sup>	7		3 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup> Significância do teste pareado, Roessler e col., 1956.

\* Significativo (p=0,05).

ns - não significativo (p=0,05).

A - feijão testemunha. B e C - feijão macerado em soluções a 1% e a 5% de metionina, respectivamente, sendo que o macerado em solução a 5% foi misturado com feijão testemunha na proporção de 1:7.

Quadro 19: Preferência para o odor e gosto do feijão Rosinha G2 macerado em solução de metionina e cozido com e sem tempero, usando-se o método de Escala Não-Estruturada<sup>1</sup>

Tratamentos	Odor de feijão		Gosto de feijão	
	Temperado	Sem tempero	Temperado	Sem tempero
A	7,83 <sup>ns</sup>	7,84*	7,44 <sup>ns</sup>	6,68*
B	7,39	7,09	7,08	6,09
C	7,28	7,22	7,19	6,07

<sup>1</sup> Cada valor representa a média de 60 repetições.

\* O tratamento A diferiu de B e C (p=0,05).

ns - não significativo (p=0,05).

A - feijão testemunha.

B - feijão macerado em solução a 5% de metionina, lavado e misturado na proporção de 1:4 com feijão testemunha.

C - feijão macerado em solução a 5% de metionina e misturado na proporção de 1:7 com feijão testemunha.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os estudos com feijões (*Phaseolus vulgaris*) são feitos, em geral, no grão integral ou farinha do mesmo. Por isso o interesse neste trabalho centralizou-se nos aspectos físico-químicos, toxicológicos, culinários e nutricionais do feijão Rosinha G2 e em frações obtidas da farinha integral. Quanto à composição, geralmente os valores estão em concordância com os vários trabalhos descritos na literatura para outras variedades do mesmo gênero.

O teor em proteína bruta, Quadro 4, foi de 26,3%, portanto, dentro da faixa de variação protéica nas leguminosas, 18-47%, Pant e Tulsiani, 1969, Lantz e col., 1958, e outros. As frações preparadas no laboratório apresentaram grande variação nos teores de proteína bruta, 15-90%, sendo o mais baixo para a fração de sólidos insolúveis em água. No feijão integral os valores de nitrogênio não-protéico, cinzas, extrato etéreo e fibra bruta estão de acordo com Moraes e Angelucci, 1971, entre outros.

Exceto para a fração dialisável, Quadro 5, a composição em aminoácidos foi semelhante em todas as demais. A metionina foi baixa em todas as frações, cerca de 0,8g/16g N, sendo o aminoácido essencial limitante, Bressani e col., 1961, Jaffé e col., 1974, Kelly, 1971, Evans e Bauer, 1978. A hidrólise ácida a 105°C pode destruir boa parte da metionina, de-

vendo a concentração da mesma ser mais elevada nas amostras estudadas. Quando feita a hidrólise a frio e a determinação pelo método de Lunder, 1973, esse valor foi em média 1,5g/16g N. A lisina variou de 7,5-8,7g/16g N, concordando com Tandon e col., 1957, que encontraram uma média de 8,45g/16g N em 25 variedades de feijões, Moraes e Angelucci, 1971, que encontraram resultados semelhantes em 12 variedades brasileiras de feijões. Isso torna o feijão um bom complemento para os cereais arroz, trigo, milho, etc., que são deficientes nesse aminoácido essencial e com teor bem mais alto que o feijão em metionina. Por outro lado, a disponibilidade da lisina, determinada por método químico, foi baixa em todas as frações, Quadro 9, cerca de 6g/16g N, reduzindo-se ainda com o tratamento térmico. O efeito do tratamento térmico foi maior no feijão integral e nos sólidos insolúveis após extração das proteínas, que com 30 minutos a 121°C tiveram a lisina disponível reduzida em cerca de 50%. Entretanto, como o método usado foi um método químico, não se pode afirmar que a disponibilidade seja a mesma *in vivo*.

A atividade *in vitro* dos fatores antinutricionais, hemaglutinina e inibidores da tripsina e da quimotripsina, foi elevada, quer no feijão integral, quer nas frações isoladas, Quadro 6. Nossos resultados concordam com os de vários pesquisadores que trabalharam com o feijão integral, Kakade e Evans, 1965a, Liener, 1976, Jaffé, 1950a, e outros. Exceto para as

frações protéicas globulina e albumina, as pesquisas sobre esses fatores são quase inexistentes para as demais frações estudadas. Nossos resultados mostram que a fração albumina apresentou a mais alta atividade, tanto para os inibidores de proteases, como para a hemaglutinina. A fração globulina apresentou atividade bem mais baixa, menor ainda nos sólidos insolú-veis. A presença de inibidores de proteases nos sólidos dialisáveis indica a existência no feijão de inibidores de baixo peso molecular ( $PM < 10.000$ ) ou uma possível fragmentação dos inibidores de peso molecular mais elevado com a produção de fragmentos ativos dialisáveis.

A inativação térmica dos fatores antinutricionais apresentou comportamento diferente quando o tratamento foi feito no grão inteiro ou extrato aquoso, Quadro 11 e Figura 7. No grão inteiro a resistência térmica dos inibidores da tripsina e da quimotripsina, bem como a da hemaglutinina, foi pequena, cerca de 10 minutos em água fervente, concordando com outros investigadores, Kunitz, 1946, Jaffé, 1950a, Liener, 1976, que afirmam serem os mesmos termolábeis. Quando o tratamento tér-mico consistiu na fervura do extrato aquoso, a atividade dos inibidores da tripsina e da quimotripsina aumentou, mantendo-se acima de 100% por mais de 2 horas. Mesmo após 60 minutos a 121°C, esses inibidores ainda mostraram alguma atividade. A hemaglutinina já estava inativada aos 5 minutos de fervura. Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho evidenciando esse fato, que contraria a afirmativa corrente de que essas pro

teínas são termolábeis. O fato de não ter sido possível detectar atividade desses fatores quando o tratamento térmico foi feito no grão pode indicar a possibilidade de haver reação ou complexação dos mesmos com algum constituinte celular. Assim sendo, a inativação, em lugar de ser térmica, seria por complexação, o que parece não ocorrer no extrato, onde há uma ativação com o tratamento térmico a 97°C, provavelmente pela exposição mais completa do centro ativo do inibidor ou pela liberação de moléculas de inibidor que se encontravam associadas com outros constituintes do extrato cru e, portanto, total ou parcialmente inativas. Por motivos ainda não evidentes, o tratamento térmico do extrato inicialmente ativa esses agentes antinutricionais que se apresentam muito termorresistentes, necessitando de condições muito mais severas para serem inativados. Admitindo a hipótese de que a inativação no grão se faz por complexação, é provável que no extrato isso não aconteça, o que determinaria a grande estabilidade térmica dos mesmos quando em solução. Esse fenômeno certamente merece futuras investigações, bem como se reveste de importância prática, uma vez que fica demonstrado que o tratamento térmico exigido para a inativação desses inibidores vai depender não só da natureza do produto, mas também das características físicas do meio.

A eletroforese em gel de poliacrilamida de extratos aquosos dos grãos tratados termicamente mostrou o desapareci-

mento das bandas correspondentes aos inibidores da tripsina e quimotripsina aos 5 minutos de aquecimento em água fervente. Com o aumento do tempo de tratamento térmico, notou-se uma diminuição do número de bandas em relação ao extrato cru, além de diminuir a mobilidade relativa de certas bandas, Figura 8. Nesse caso ficou também evidenciado que o tratamento térmico do grão inteiro provocou a insolubilização dos inibidores de tripsina e de quimotripsina, de tal forma que as bandas de maior mobilidade eletroforética correspondentes a tais inibidores desapareceram do perfil eletroforético.

No estudo *in vivo*, a toxicidade do feijão e de suas frações foi extremamente elevada, provocando letalidade total dos ratos num período de 3 a 23 dias, Quadro 7. Para o estudo com o feijão integral, a letalidade dos ratos em tão curto prazo, de 4 a 8 dias, concorda com Kakade e Evans, 1965a, Bresani e col., 1963. O fato de termos encontrado toxidez em todas as frações obtidas da farinha integral não confirmou a nossa hipótese inicial de que a toxidez do feijão, quando cru, poderia ser concentrada em apenas uma fração, o que facilitaria posterior isolamento e provavelmente a identificação do composto ou compostos responsáveis pelo efeito tóxico. Essa verificação sugeriu a possibilidade de tal substância tóxica se ligar inespecificamente aos componentes das diversas frações obtidas. Por outro lado, a elevada toxidez da fração diálisável sugeriu a existência no feijão de substâncias altamen

te tóxicas de baixo peso molecular e dialisáveis quando no estado livre. Essas substâncias poderiam ser as mesmas que estariam ligadas aos componentes macromoleculares das demais frações causando a toxidez aguda e a morte dos animais experimentais com poucos dias de ingestão das dietas contendo tais materiais. A toxidez aguda da farinha integral e das frações dela obtidas não parece ser devida à ação exclusiva de agentes antinutricionais como os inibidores de proteases e das fitohemaglutininas, embora esses possam contribuir para o efeito tóxico total. Esses compostos altamente tóxicos, aparentemente ainda não conhecidos, seriam altamente termolábeis, pois tratamento térmico bastante brando, insuficiente para inativação completa dos agentes antinutricionais conhecidos, elimina a toxidez aguda, melhorando substancialmente o valor biológico das proteínas em tais amostras. Se esta não for a explicação para a fácil eliminação da toxidez aguda e melhoria rápida do valor biológico das proteínas com um tratamento térmico brando, então poderíamos supor que existam pelo menos 2 classes de agentes antinutricionais no feijão, uma altamente tóxica e muito termolábil, sendo facilmente eliminada pela ação do calor e, outra mais termorresistente, porém de baixa toxicidade.

A adição de metionina às dietas, ao contrário do que acontece com a soja crua, também não eliminou o efeito tóxico, o mesmo acontecendo com a eliminação da casca ou a ex-

tração com etanol a 70%. Ratos alimentados com dietas de caseína acrescida de casca de feijão não mostraram sinal de intoxicação, o que sugere que os componentes da casca não são responsáveis pela toxidez. É importante notar que apenas 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos de aquecimento a 97°C foram suficientes para eliminar os fatores tóxicos do feijão macerado por 12 horas. Esse tratamento foi suficiente para elevar o PER a um valor quase máximo para o feijão, o que só foi atingido entre 10 e 15 minutos a 97°C. Após 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos de aquecimento a atividade anti-trípica residual era ainda 34% da original e a hemaglutinante cerca de 10%, sendo ainda considerada alta, necessitando de apenas 37µg de proteína/ml para provocar hemaglutinação. Isso sugere não serem esses fatores os únicos responsáveis pela toxidez do feijão, o que contraria a maioria dos trabalhos publicados a esse respeito, Jaffé, 1968, Honavar e col., 1962, dentre outros que indicam essas substâncias como responsáveis pela toxidez e pela alta letalidade do feijão cru. Outro fato que ficou evidenciado pelos resultados desta pesquisa é que tratamentos térmicos mais reduzidos que os descritos na literatura como ideais já foram suficientes para afetar negativamente o valor nutritivo das proteínas quanto ao PER. Autoclavagem a 121°C por 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos foi melhor do que por 15 e 30 minutos, para o valor biológico das proteínas do feijão integral e para as frações albumina, globulina e isolado protéico total, Quadro 10. Esses resultados contrariam alguns autores, entre

os quais Bressani e col., 1963, que dizem serem necessários 30 minutos em autoclave a 121°C para o feijão alcançar o melhor valor nutricional em termos de PER. Tais discrepâncias poderiam ser atribuídas a diferenças entre variedades quanto à sensibilidade ao tratamento térmico.

A digestibilidade *in vitro* do feijão e suas frações, quando no estado cru, foi sempre baixa, cerca de 45%. Após a autoclavagem houve uma melhoria sensível, chegando até 78% para as globulinas. Para as albuminas ela foi menor, tanto *in vitro* como *in vivo*, embora tenha melhorado com o tratamento térmico. Para o feijão integral, o efeito do tratamento térmico foi relativamente reduzido e como consequência a digestibilidade continuou baixa em relação às globulinas isoladas. Vaintráub e col., 1976, verificaram baixa digestibilidade das proteínas de 13 espécies de leguminosas, sendo os valores mais baixos encontrados para as espécies do gênero *Phaseolus*. O fato de as globulinas apresentarem digestibilidade relativamente elevada está em desacordo com Seidl e col., 1969, que observaram em uma fração globulínica de feijões pretos, resistência à ação de 7 enzimas proteolíticas, incluindo as digestivas e que, mesmo após a desnaturação com uréia, a digestibilidade não melhorou muito. Segundo esses autores, essa proteína, que representava mais de 30% das proteínas totais do feijão, contribuiria decisivamente para a baixa digestibilidade protéica dessa leguminosa.

Os estudos realizados até o presente ainda não permitiram uma conclusão de quais transformações são responsáveis pela perda das qualidades originais do feijão durante o armazenamento. Neste trabalho, o feijão foi estocado em 3 condições diferentes, observando-se que quanto maior o tempo, temperatura e umidade relativa, maiores foram os prejuízos para os parâmetros físico-químicos, culinários e nutricionais, Figuras 9, 10, 11, 12 e Quadro 12. Das 3 condições de estocagem, a mais severa foi aquela a 37°C e 76% de umidade relativa, tendo apresentado a maior depreciação das características originais do feijão. A textura medida no Instron ultrapassou a 500kg-força no fim de 4 meses, quando comparada com 238kg-força após a colheita, não havendo referência na literatura quanto a um estudo semelhante. O tempo de cocção ultrapassou 4 horas, apresentando ainda características de enrijecimento, observação também referida por Muneta, 1964 e Molina e col., 1975. Outras características físico-químicas, como solubilidade das proteínas, percentagem de grãos casca dura, cor do tegumento, capacidade de absorção de água, também foram depreciadas, o que já havia sido observado por vários pesquisadores, entre os quais Morris e Wood, 1956, Takayama e col., 1965 e Kon, 1968.

Muito importante foi a constatação do decréscimo no valor nutricional do feijão em função das condições de estocagem, para o que não encontramos nenhuma referência na literatura.

tura. Os valores de PER, digestibilidade *in vivo* das proteínas, disponibilidade biológica da metionina e cisteína, diminuíram progressivamente com o aumento do tempo e condições mais desfavoráveis de estocagem, sendo os valores mais baixos registrados para a condição de 37°C e 76% de umidade relativa. O PER reduziu-se em 90%, enquanto a disponibilidade de metionina e de cisteína em cerca de 50%. Evans e col., 1974, Evans e Bauer, 1978, já haviam observado que a disponibilidade biológica da metionina em feijões era baixa, da ordem de 50%. Com esta pesquisa fica demonstrado que a disponibilidade diminui ainda mais em função do tempo e das condições inadequadas de armazenamento. Futuras investigações deverão procurar esclarecer os mecanismos de perda de disponibilidade dos aminoácidos sulfurados, assim como os agentes causadores dessa perda.

É muito importante chamar a atenção para o fato de que a perda de valor biológico das proteínas de feijão parece estar diretamente relacionada com a disponibilidade biológica da metionina e cisteína, embora outros fatores possam interferir. Nossos estudos mostraram que um feijão estocado em ambiente por 18 meses sofreu uma redução até valores negativos de PER, depois elevados para 2,5, mediante a adição de metionina nas dietas, Quadro 13. Isso mostra que a metionina adicionada não só recuperou o valor biológico da proteína, perdido com a estocagem, mas ainda o elevou para níveis iguais àqueles do feijão enriquecido logo após a colheita. Contudo as propri

idades físico-químicas, culinárias e de digestibilidade *in vivo* das proteínas continuaram alteradas.

Os resultados mostram uma perda do valor nutricional do feijão como consequência da estocagem. Para garantir a conservação das qualidades nutricionais do produto nos programas de armazenamento, haveria necessidade de um rigoroso controle da temperatura e da umidade relativa do ar. O tempo de estocagem não é o fator negativo mais importante na depreciação do feijão, quando a umidade nos grãos for mantida no limite máximo de 10% e a temperatura a mais baixa possível.

Sendo o feijão e suas frações protéicas deficientes em metionina, como ficou evidenciado no Quadro 5, a adição desse aminoácido melhorou os valores de PER e o crescimento, Quadro 14 e Figura 14, respectivamente. Pesquisadores como Kakade e Evans, 1965b, Bressani e col., 1963, afirmaram que o crescimento dos ratos e a eficiência de dietas com feijão autoclavado foram comparáveis com a de caseína, quando foi adicionada metionina à dieta contendo tais feijões. Nossos resultados mostraram que o feijão integral e as frações protéicas albumina, globulina e isolado protéico total apresentaram valores de PER em torno de 0,7 quando autoclavados a 121°C por 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos, que foram elevados para 245; 401; 428 e 440, respectivamente, ao ser adicionado 3% de metionina e 2% de cisteína, em relação às dietas, sendo o valor obtido para a caseína de 3,36. É interessante notar que a digestibilidade *in vivo* não melhorou com a adição de metionina, mas a taxa de utiliza

ção das dietas e os valores de PER foram bem superiores para os animais que receberam na dieta proteína isolada, em comparação aos que receberam feijão integral. O maior incremento de PER com a adição de metionina nas frações protéicas isoladas, quando comparado com o da farinha integral, poderia ser explicado em função dos seguintes fatores: a) maior digestibilidade dessas proteínas isoladas, comparadas com as do feijão integral; b) maior índice de utilização biológica de cada um dos aminoácidos essenciais; c) possível existência de um ou mais fatores que inibem parcialmente a utilização biológica da proteína no feijão integral, inibindo em parte o crescimento dos ratos. A existência de possíveis fatores tóxicos termorresistentes no feijão autocalvado foi sugerida por Evans e Bauer, 1978.

Devido à deficiência marcante de metionina no feijão, pensou-se em pesquisar um método que permitisse a incorporação da mesma nos grãos inteiros e que o produto resultante fosse passível de comercialização. A literatura a esse respeito não apresenta nada que possa ser considerado prático e factível. Os resultados, Figuras 15, 16 e 17, mostram que, variando a concentração de metionina na solução, o tempo e a temperatura de maceração, foi possível estabelecer a melhor condição de sua incorporação ao feijão. Maceração dos grãos por 1 hora a 50°C em solução a 5% de metionina, elevou a sua concentração para 24g - por 100g de proteínas de feijão, permitindo usá-los em mistura com feijão testemunha, na proporção de 1:7, dando ainda um produto final com teor aproximado de metionina de 3g/16g N. Esse

teor de metionina foi semelhante ao da caseína, sendo que o produto final apresentou boa aparência e valor nutricional consideravelmente melhorado em relação ao testemunha, como pode ser observado no Quadro 16. Quando o feijão enriquecido foi macerado em água e depois cozido com e sem a água de maceração, os valores de PER foram de 2,4 e 1,3, respectivamente. Isso acontece porque parte da metionina que foi incorporada ao feijão passa para a água durante a maceração e, sendo a mesma eliminada, reduz-se a sua concentração. A análise sensorial desse produto não evidenciou nenhuma diferença estatística quanto à sua aceitação em relação à testemunha ao nível de significância de 5% , Quadro 18 e 19. O método de incorporação, através da maceração em solução de metionina é de simples realização e poderá ser justificável nos casos em que o feijão participa da dieta de uma população e que a mesma seja reconhecidamente pobre em metionina. De qualquer maneira, foi possível, sem alterar as características sensoriais e de aparência, melhorar o valor nutricional do feijão por um procedimento que poderá ser praticado industrialmente em escala comercial.

A disponibilidade biológica da metionina incorporada ao feijão pelo processo de maceração, determinada pela taxa de absorção em ratos através de balanço metabólico foi de 100% , Quadro 17, sendo de 55,8% no feijão testemunha, concordando com dados de Evans e Bauer, 1978.

## CONCLUSÕES

No feijão Rosinha G2 integral e em várias frações obtidas do mesmo, detectou-se elevada atividade dos agentes antinutricionais - hemaglutinina e inibidores de tripsina e quimotripsina - mais acentuada na fração albumina.

A resistência térmica desses 3 fatores antinutricionais foi pequena, menos de 10 minutos em água fervente, quando o tratamento foi no grão inteiro, ao contrário do extrato aquoso, quando o tratamento a 98°C provocou ativação dos inibidores de proteases que permaneceu acima de 100% por mais de 2 horas de fervura, em banho de água, detectando-se pequena atividade residual mesmo após 60 minutos a 121°C.

Quando cruas, todas as frações, mesmo com adição de metionina, eliminação da casca ou extração com etanol, foram altamente tóxicas, provocando letalidade total nos ratos em poucos dias. A digestibilidade *in vitro* dessas frações foi sempre baixa, não ultrapassando a 50%.

Os fatores tóxicos do feijão e de suas frações foram muito termolábeis, necessitando de apenas 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minutos em água fervente para eliminar a letalidade dos ratos e elevar o seu valor nutricional, em termos de PER, quase ao máximo. Esse tratamento térmico não foi suficiente para inativar completamente os fatores antinutricionais antitripsina e hemaglutinina, mostrando não serem esses os únicos constituintes tóxi-

cos, como tem sido preconizado por vários pesquisadores.

A adição de metionina às proteínas isoladas do feijão elevou significativamente os valores de PER, evidenciando o papel limitante desse aminoácido sulfurado, sendo o efeito dessa adição pelo menos 2 vezes maior do que quando adicionada à farinha integral do feijão.

A estocagem prejudicou as propriedades originais do feijão, sendo tal depreciação progressivamente elevada com o aumento do tempo, temperatura e umidade relativa. Após estocagem por 6 meses a 37°C e 76% de umidade relativa, o tempo de cocção e a textura aumentaram mais de 4 vezes, enquanto os valores de PER diminuíram de 90% e os de disponibilidade de metionina e cisteína de 50%. Quando a estocagem, pelo mesmo período, foi a 12°C e 52% de umidade relativa, as características físico-químicas, culinárias e nutricionais não sofreram alterações significativas. A adição de metionina não só recuperou os valores de PER, como os elevou significativamente, mostrando ser a mesma a principal responsável pela perda de valor nutricional durante a estocagem do feijão.

A maceração revelou-se como um processo eficiente para incorporar metionina no feijão em grãos, com teor mais elevado, 24g/16g N, para o feijão macerado por 1 hora a 50°C, em solução de metionina a 5%. Esse feijão misturado com o testemunha, até o nível de metionina de 3g/16g N, apresentou um valor nutricional, em termos de PER, 2,5 vezes maior ao teste

munha e a análise sensorial não apresentou diferença estatística ao nível de 5% quanto a sua aceitação. A absorção biológica da metionina adicionada por maceração foi de 100%, sendo no máximo de 56% para o feijão.

Autoclavagem a 121°C ocasionou decréscimo nos valores de PER em função do aumento de tempo para o feijão integral, albuminas, globulinas e isolado protéico total.

A lisina disponível sofreu redução em todas as frações tratadas termicamente, sendo a perda mais acentuada para a farinha integral.

## BIBLIOGRAFIA

- ABRAMOVA, E.P. & CHERNIKOV, M.P. Content of proteinase inhibitors in seeds of some leguminous plants. *Vop.Pitan.*, 23: 13, 1964.
- AKESON, W.R. & STAHMANN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.*, 83:257, 1964.
- ALLISON, J.B. Biological evaluation of proteins. *Physiol. Rev.*, 35:664, 1955.
- ALLISON, J.B. The nutritive value of dietary proteins. In MUNRO, H.N. & ALLISON, J.B. ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York, Academic Press, 1964. v.2 p.45.
- AMBROSE, A.M. Naturally occurring antienzymes (inhibitors). In NAS/NRC. *Toxicants occurring naturally in foods*. Washington, D.C., 1966. p.105-111. (Publication 1354).
- AMERINE, M.A.; PANGBORN, R.M. & ROESSLER, E.B. *Modern methods of evaluation of food*. New York, Academic Press, 1963. p.330.
- ANDREWS, A.T. Navy (Haricot)-bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin: isolation and characterization of two components from a toxic agglutination extract. *Biochem. J.*, 139:421, 1974.
- ANDREWS, A.T. & JAYME-WILLIAMS, D.J. The identification of a phytohaemagglutinin in raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) toxic for Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Brit. J. Nutr.*, 32:181, 1974.
- ANTUNES, P.L. *Algumas propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas da soja *Glycine max* (L.) Merrill*. Campinas, 1974. Tese (Mestrado). Fac. Eng. Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas.

- ANTUNES, A.J. & MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. *J. Agric. Food Chem.*, 25:1096, 1977.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. "Official methods of analysis". Washington, D.C., 1955, 1970 e 1975.
- ASTM. Manual on sensory testing methods. Philadelphia. American Society for Testing and Materials, 1969. p.51. (STP-439).
- BALDI, G. & SALAMINI, F. Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species. *Theorit. Appl. Genetics*, 43:75, 1973.
- BARNES, R.H.; MAACK, J.E.; KNIGHTS, M.R. & BURR, G.O. Measurement of the growth-promoting quality of dietary protein. *Cereal Chem.*, 22:273, 1945.
- BATEN, W.D. Organoleptic tests pertaining to apples and pears. *Food Research*, 11:84, 1946.
- BECKER, H.C.; MILNER, R.T. & NAGEL, R.H. A method for the determination of nonprotein nitrogen in soybean meal. *Cereal Chem.*, 17:447, 1940.
- BECKMAN INSTRUMENTS. How to make a protein hydrolyzate analysis with the model 120C amino acid analyzer. Spinco Division Beckman Instruments, Stanford Park, Palo Alto, California, 1966. (Procedures manual 120-PM-1).
- BELTER, P.A. & SMITH, A.K. Protein denaturation on soybean meal during processing. *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 29:170, 1952.
- BETHLEM, M.L.B.; NEVES, J.P.; MALOUX, F. & TAVEIRA, M. Composição centesimal de 50 variedades de feijões existentes no Brasil. *Anais Fac. Farm.*, Rio de Janeiro, 4:234, 1952/54.
- BERD, G.W.G. Haemagglutinins in seeds. *Brit. Med. Bull.* 15:165, 1959.

- BORCHERS, R. & ACKERSON, C.W. The nutritive value of legume seeds. X. Effect of autoclaving and trypsin inhibitor test for 17 species. *J. Nutr.*, 41:339, 1950.
- BORCHERS, R.; ACKERSON, C.W. & SANDSTEDT, R.M. Trypsin inhibitor. III. Determination and heat destruction of the trypsin inhibitor of soybeans. *Arch. Biochem.*, 12:367, 1947.
- BOURNE, M.C. Size, density, and hardshell in dry beans. *Food Technol.*, 21:17A, 1967.
- BOURNE, M.C. Texture measurement of individual cooked dry beans by the puncture test. *J. Food Sci.*, 37:751, 1972.
- BOURNE, M.C. & MOYER, J.C. The extrusion principle in texture measurement of fresh peas. *Food Technol.*, 22:1013, 1968.
- BOURNE, M.C.; MOYER, J.C. & HAND, D.B. Measurement of food texture by a universal testing machine. *Food Technol.*, 20:522, 1966.
- BOWMAN, D.E. Fractions derived from soybeans and navy beans which retard tryptic digestion of casein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57:139, 1944.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119:419, 1954.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. & NAVARRETE, D.A. The essential amino acid content of samples of black beans, red beans, rice beans, and cowpeas of Guatemala. *J. Food. Sci.*, 26:525, 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, 1963.
- BRUCHER, O.; WECKSLER, M.; LEVY, A.; PALOZZO, A. & JAFFÉ, W.G. Comparison of phytohaemagglutinins in wild beans (*Phaseo-*

- lus aborigineus*) and in common beans (*Phaseolus vulgaris*) and their inheritance. *Phytochemistry*, 8:1739, 1969.
- BURKARD, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2a. ed. Buenos Aires, Acme Agency, 1952.
- BURR, H.K.; KON, S. & MORRIS, H.J. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. *Food Technol.*, 22:336, 1968.
- CALIL, J. O problema do feijão no Brasil. *Arq. Brasil. Nutr.*, 22:79, 1966.
- CALLOWAY, D.H.; HICKEY, C.A. & MURPHY, E.L. Reduction of intestinal gas-forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. *J. Food Sci.*, 36:251, 1971.
- CATSIMPOOLAS, N. & MEYER, E.W. Isolation of soybean hemagglutinin and demonstration of multiple forms by isoelectric focusing. *Arch. Biochem. Biophys.*, 132:279, 1969.
- COCHRAN, W.G. & COX, G.M. ed. Experimental designs. 2a. ed. New York, Wiley, 1957. 611 p.
- CONSTANTINIDES, S.M.; SGARBIERI, V.C. & GALEAZZI, M.A.M. Experimentos em bioquímica e nutrição. Manual de laboratório, 1976 (a ser publicado).
- DAVIS, B.J. Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 121:404, 1964.
- DE MUELENAERE, H.J.H. Toxicity and haemagglutinating activity of legumes. *Nature*, 206:827, 1965.
- DUNNETT, C.W. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Stat. Assn.*, 50:1096, 1955.

- DURIGAN, J.F. Influência do tempo e das condições de estocagem sobre as propriedades químicas, físico-mecânicas e nutricionais do feijão Mulatinho (*Phaseolus vulgaris*, L.). Campinas, 1979. 81 p. Tese (Mestrado). Fac. Eng. Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas.
- ELIAS, L.G. & BRESSANI, R. Nutritional factors affecting the consumption of leguminous seeds. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 24: 365, 1974.
- ELIAS, L.G.; HERNANDEZ, M. & BRESSANI, R. The nutritive value of precooked legume flours processed by different methods. *Nutr. Reports Intl.*, 14:385, 1976.
- EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L. & BAUER, D.H. Effect of heating proteins in the autoclave on the liberation of cystine and methionine by several digestion procedures. *J. Agric. Food Chem.*, 10:416, 1962.
- EVANS, R.J. & BANDEMER, S.L. Nutritive value of legume seed proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 15:439, 1967.
- EVANS, J.E. & BAUER, D.H. Studies of the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*, 26:779, 1978.
- 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, 1974.
- EVERSON, G. & HECKERT, A. The biological value of some leguminous sources of protein. *J. Amer. Dietet. Assn.*, 28:81, 1944.
- FAO/WHO. Expert Group: *WHO Tech. Rept. Ser.*, 301:36, 1965.
- FEENEY, R.E.; MEANS, G.E. & BIGLER, J.C. Inhibition of human trypsin, plasmin, and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.*, 244:1957, 1969

- FISHER, R.A. & YATES, F. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Table III. *Oliver & Boyd*, Edinburg, 1963. p.146.
- FRIEDMAN, M., ed. Protein nutritional quality of foods and feeds. New York, Marcell Dekker, 1975. v.1, pt.1-2.
- GARRUTI, R.S. Metodologia na seleção sequencial e não-sequencial de provadores para análise sensorial de alimentos e bebidas. Campinas, 1976. 221 p. Tese (Doutorado). Fac. Eng. Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas.
- GODDARD, V.R. & MENDEL, L.B. Plant hemagglutinins with special reference to a preparation from the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Biol. Chem.* 82:447, 1929.
- GOMES, E.P. Curso de estatística experimental. 4a. ed. São Paulo, Liv. Nobel, 1970. 430 p.
- GREER, M.A. & ASHWOOD, E.B. The antithyroid effect of certain foods in man as determined with radioactive iodine. *Endocrinology*, 43:105, 1948.
- HALL, T.C. Distribution and separation of some proteins from the bean plant. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 95:335, 1970.
- HAM, W. & SANDSTEDT, R.M. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal. *J. Biol. Chem.*, 154:505, 1944.
- HEDIN, P.A. & ADACHI, R.A. Effect of diet and time of feeding on gastrointestinal gas production in rats. *J. Nutr.*, 77:229, 1962.
- HELLENDORRN, E.W. Intestinal effects following ingestion of beans. *Food Technol.*, 23:795, 1969.
- HONAVAR, 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, 1962.

- ISHINO, K. & ORTEGA, M.L. Fractionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, 23:529, 1975.
- JAFFÉ, W.G. Limiting essential amino acids in some legume seeds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71:398, 1949a.
- JAFFÉ, W.G. Toxicity of raw kidney beans. *Experientia*, 5:81, 1949b.
- JAFFÉ, W.G. Study on the inhibitors of growth of rats by certain legume seeds. *Acta Cient. Venez.*, 1:62, 1950a.
- JAFFÉ, W.G. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 75:219, 1950b.
- JAFFÉ, W.G. The comparative biological value of some legumes important in Venezuelan nutrition. *Arch. Venez. Nutr.*, 1:108, 1950c.
- JAFFÉ, W.G. Über Phytotoxine aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*). *Arstl. Forsch.*, 12:1012, 1961.
- JAFFÉ, W.G. Factores tóxicos en leguminosas. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 18:205, 1968.
- JAFFÉ, W.G. & BRUCHER, O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 22:267, 1972.
- JAFFÉ, W.G. & BRUCHER, O. El contenido de nitrógeno total y aminoácidos azufrados en diferentes líneas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 24:107, 1974.
- JAFFÉ, W.G.; BRUCHER, O. & PALOZZO, A. Detection of four types of specific phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Z. Immun. Forsch. Bd.*, 142:439, 1972.
- JAFFÉ, W.G. & FLORES, M.E. La cocción de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 25:79, 1975.

- JAFFÉ, W.G. & GAEDE, K. Purification of a toxic phytohaemagglutinin from black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Nature*, London, 183:1329, 1959.
- JAFFÉ, W.G. & HANING, K. Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 109:80, 1965.
- JAFFÉ, W.G. & LETTE, C.L.V. Heat-labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.*, 94:203, 1968.
- JAFFÉ, W.G.; LEVY, A. & GONZÁLEZ, D.I. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochemistry*, 13:2685, 1974.
- JOHNS, C.O. & FINKS, A.J. The deficiency of cystine in proteins of the genus *Phaseolus*. *Science*, 52:414, 1920.
- JONES, G.; MOORE, S. & STEIN, W.H. Properties of chromatographically purified trypsin inhibitors from lima beans. *Biochemistry*, 2:66, 1963.
- KABAT, E.A. & MAYER, M.M. Aglutinación. In KABAT, E.A. & MAYER, M.M. *Inmunoquímica experimental*. La Prensa Médica. México, 1968. p. 89-122.
- 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, 1969.
- KAKADE, M.L. & BORCHERS, R. Gastrointestinal gas production in rats fed raw and heated navy beans with or without added antibiotics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124:1272, 1967.
- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. Growth inhibition of rats fed navy bean fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 13:450, 1965a.
- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. Nutritive value of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Brit. J. Nutr.*, 19:269, 1965b.

- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. Growth inhibition of rats fed raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.*, 90:191, 1966.
- KAKADE, M.L. & LIENER, I.E. A simplified procedure for the determination of "available" lysine in proteins and protein foodstuffs. *Analyt. Biochem.*, 27:273, 1969.
- 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, 1969.
- KAKADE, M.L.; SMITH, J.E. & BORCHERS, R. Effect of a navy bean fraction on protein synthesis in rats. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 128:811, 1968.
- KAKADE, M.L.; SWENSON, D.H. & LIENER, I.E. Note on the determination of chymotrypsin and chymotrypsin inhibitor activity using casein. *Analyt. Biochem.*, 33:255, 1970.
- KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). *Econ. Bot.*, 19:358, 1965.
- 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, 1971.
- KLING, J.W. & RIGGS, L.A. Woodworth and Schlosberg's experimental psychology. London, Methuen, 1961. p. 51-54.
- KON, S. Pectic substances of dry beans and their possible correlation with cooking time. *J. Food Sci.*, 33:437, 1968.
- KORTE, R. Heat resistance of phytohemagglutinins in weaning food mixtures containing beans (*Phaseolus vulgaris*). *Ecol. Food Nutr.*, 1:303, 1972.
- KUNITZ, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101:668, 1945.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. I. Method of isolation. *J. Gen. Physiol.*, 29:149, 1946.

- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30:291, 1947.
- LANDSTEINER, K. & KAUBITSCHKEK, L. Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. *Zbl. Bakt. Abt. II*, 45:660, 1908.
- LANTZ, E.M.; GOUGH, H.W. & CAMPBELL, A.M. Effect of variety, location, and years on the protein and amino acid content of dried beans. *J. Agric. Food Chem.*, 6:58, 1958.
- LASKOWSKI, M. & LASKOWSKI, Jr., M. Naturally occurring trypsin inhibitors. *Advanc. Protein Chem.* 9:203, 1954.
- LIENER, I.E. Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. *J. Nutr.*, 49:527, 1953.
- LIENER, I.E. The photometric determination of hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 54:223, 1955.
- LIENER, I.E. The intraperitoneal toxicity of crude concentrates of the trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 193:183, 1959.
- LIENER, I.E. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 11:281, 1962.
- LIENER, I.E. Toxic substances associated with seed proteins. In GOULD, R.F. "World Protein Resources". Washington, D.C. American Chemical Society, 1966. p.178-193. (Advances in Chemistry Series, 57).
- LIENER, I.E. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. *J. Food. Sci.*, 41:1076, 1976.
- LIENER, I.E. & PALLANSCH, M.J. Purification of a toxic substance from defatted soybean flour. *J. Biol. Chem.*, 197:29, 1952.
- LIS, H.; FRIDMAN, C.; SHARON, N. & KATCHALSKI, E. Multiple hemagglutinins in soybean. *Arch. Biochem. Biophys.*, 117:301, 1966.

- LIS, H.; SHARON, N. & KATCHALSKI, E. Soybean hemagglutinin, a plant glycoprotein. I. Isolation of a glycopeptide. *J. Biol. Chem.*, 241:684, 1966.
- LUGG, J.W.H. Plant proteins: toxic proteins, trypsin inhibitors, and enzymes. *Adv. Protein Chem.* 5:263, 1949.
- LUNDER, T.L. An improved method for the colorimetric determination of methionine in acid hydrolysates of biological products. *Ind. Aliment.*, 12:94, 1973.
- MCCOLLUM, E.V.; SIMMONDS, N. & PITZ, W. The dietary deficiencies of the white bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 29:521, 1917.
- MENDEL, L.B. Vegetable agglutinins. *J. Biol. Chem.*, 6:19, 1909.
- MITCHELL, H.H. A method of determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.*, 58:873, 1924.
- MOLINA, M.R.; BATEN, M.A.; GOMEZ-BRENES, R.A.; KING, K.W. & BRESSANI, R. Heat treatment: a process to control the development of the hard-to-cook phenomenon in black beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 41:661, 1976.
- MOLINA, M.R.; FUENTE, G. & BRESSANI, R. Interrelaciones entre tiempo de remojo, tiempo de cocción, valor nutritivo y otras características del frijol *Phaseolus vulgaris*. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 24:469, 1974.
- MOLINA, M.R.; FUENTE, G. & BRESSANI, R. Interrelationship between storage, soaking time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Sci.*, 40:587, 1975.
- MORAES, R.M. & ANGELUCCI, E. Chemical composition and amino acid contents of Brazilian beans *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Sci.*, 36:493, 1971.
- MORRIS, H.J.; OLSON, R.L. & BEAN, R.C. Processing quality of varieties and strains of dry beans. *Food Technol.*, 4:247, 1950.

- MORRIS, J.F. & WOOD, E.R. Influence of moisture content on keeping quality of dry beans. *Food Technol.*, 10:225, 1956.
- MUNETTA, P. The cooking time of dry beans after extended storage. *Food Technol.*, 18:130, 1964.
- NORTHROP, J.H. & KUNITZ, M. Crystallization of trypsin from bovine pancreas. *Science.*, 73:262, 1931.
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. Beobachtungen über Wachstum bei Fütterungsversuchen mit isolierten Nahrungssubstanzen. *Hoppe Seilers Z. Physiol.Chem.*, 80:307, 1912.
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. The use of soybean as food. *J. Biol. Chem.*, 32:369, 1917.
- OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B. & FERRY, E.L. A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. *J. Biol. Chem.*, 37:223, 1919.
- 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. Ed. Agric.*, 24:937, 1973.
- PANT, R. & TULSIANI, D.R.P. Free amino acid analysis of *Phaseolus* seeds. *J. Food Sci. Technol.*, 5:138, 1968.
- PANT, R. & TULSIANI, D.R.P. Solubility, amino acid composition and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 17:361, 1969.
- PALOZZO, A. & JAFFÉ, W.G. Immunoelectrophoretic studies with bean proteins. *Phytochemistry*, 8:1255, 1969.
- 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, 1966.
- PUSZTAI, A. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. *Nutr. Abstr. Rev.*, 37:1, 1967.

- PUSZTAI, A. General properties of a protease inhibitor from the seeds of kidney bean. *European J. Biochem.*, 5:252, 1968.
- PUSZTAI, A.; GRANT, G. & PALMER, R. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the isolation and partial characterization of toxic constituents. *J. Sci. Ed. Agric.*, 26: 149, 1975.
- PUSZTAI, A. PALMER, R. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the toxic principle. *J. Sci. Ed. Agric.*, 28:620, 1977.
- RAFFENSPERGER, E.L.; PERYAM, D.R. & WOOK, K.R. Development of a scale for grading toughness-tenderness in beef. *Food Technol.*, 12:627, 1956.
- RENA, A.B. & VIEIRA, C. Efeito da colheita, em diferentes estágios de maturação, na produção e na qualidade do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Experientiae*, 11:239, 1971.
- RICHARDS, E.A.; STEGGERDA, F.R. & MURATA, A. Relationship of bean substrates and certain intestinal bacteria to gas production in the dog. *Gastroenterology*, 55:502, 1968.
- RIGAS, D.A. & OSGOOD, E.E. Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, 212:607, 1955.
- RIVERA, A. & MUELLER, G.C. Differentiation of the biological activities of phytohaemagglutinin affecting leucocytes. *Nature*, 212:1207, 1966.
- ROCKLAND, L.B.; GARDINER, B.L. & PIECZARKA, D. Stimulation of gas production and growth of *Clostridium perfringens* type A (n93624) by legumes. *J. Food Sci.*, 34:411, 1969.
- ROCKLAND, L.B. & METZLER, E.A. Quick-cooking lima and other dry beans. *Food Technol.*, 21:344, 1967.
- ROESSLER, E.B.; BAKER, G.A. & AMERINE, M.A. One-tailed and two-tailed tests in organoleptic comparisons. *J. Food Res.* 21:117, 1956.

- SAINT-PAUL, M. Les hémagglutinins. *Transfusion*, 4:3, 1961.
- SATTERLEE, L.D.; BEMBERS, M. & KENDRICK, J.G. Functional properties of the Great northern bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolated. *J. Food Sci.*, 40:81, 1975.
- SCHNEIDER, E.C. The hemagglutinating and precipitating properties of the bean (*Phaseolus*). *J. Biol. Chem.*, 11:47, 1911.
- SCHWIGERT, B.S. & GUTHNECK, B.T. Utilization of amino acids from food by the rat. III. Methionine. *J. Nutr.* 54:333, 1954.
- SEIDL, D.; JAFFÉ, M. & JAFFÉ, W.G. Digestibility and proteinase inhibitory action of a kidney bean globulin. *J. Agric. Food Chem.*, 17:1318, 1969.
- SGARBIERI, V.C.; GARRUTI, R.S.; MORAES, M.A.C. & HARTMAN, L. Nutritional and sensory evaluation of mixtures of soybean (*Glycine max*, L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) , for direct use as human food. *J. Food Sci.*, 43:208, 1978.
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, 177:949, 1972.
- SILVA, V.R. & IACHAN, A. Proteins from varieties of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). I. Quantification and fractionation of proteins. *Rev. Brasil. Tecnol.*, 6:133 , 1975a.
- SILVA, V.R. & IACHAN, A. Proteins from varieties of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). II. Amino acid composition. *Rev. Brasil. Tecnol.*, 6:143, 1975b.
- SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. Soybeans: chemistry and technology. v.1. Proteins. In SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. AVI Publishing, Westport, Conn., 1972.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30:1190, 1958.

- SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. *Analyt. Chem.*, 39:1412, 1967.
- STEAD, R.H.; DE MUELENAERE, H.J.H. & QUICKE, G.V. Trypsin inhibition, hemagglutination, and intraperitoneal toxicity in extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 113:703, 1966.
- STEGGERDA, F.G. & DIMMICK, J.F. Effects of bean diets on concentration of carbon dioxide in flatus. *Amer. J. Clin. Nutr.* 19:120, 1966.
- SUN, S.M. & HALL, T.C. Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 23:184, 1975.
- TAKAYAMA, K.K.; MUNETA, P. & WIESE, A.C. Lipid composition of dry beans and its correlation with cooking time. *J. Agric. Food Chem.*, 13:269, 1965.
- THOMAS, K. Biological value and the behavior of the food and tissue proteins. *J. Nutr.*, 2:419, 1929.
- VAITRAUB, I.A.; BASSUNER, R. & SHUTOV, A.D. The action of trypsin and chymotrypsin on the reserve proteins of some leguminous seeds. *Nahrung*, 20:763, 1976.
- WAGNER, L.P. & RIEHM, J.P. Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor isolated from the navy bean. *Arch. Biochem. Biophys.*, 121:672, 1967.
- WARNER, R.G. Nutrient requirements of the laboratory rat. In NAS/NRC. Nutritional requirements of the laboratory rats. Washington, D.C., NAS/NRC, 1962. p.51-81 (Publication 990).
- WELLS, T.A.G. The rat. A practical guide. In WELLS, T.A.G. New York, N.Y. Dover Publications, 1968.
- WILSON, R.E. Humidity control by means of sulfuric acid solutions, with critical compilation of vapor pressure data. *J. Ind. Eng. Chem.*, 13:326, 1921.

WOMACK, M.; BODWELL, C.E. & VAUGHAN, D.A. Estimation of changes in the availability of each individual essential amino acid in food proteins. *J. Food Sci.*, 39:490, 1974.

ZIMMERMANN, G.; WEISSMANN, S. & YANNAI, S. The distribution of protein, lysine and methionine, and antitryptic activity in the cotyledons of some leguminous seeds. *J. Food Sci.*, 32:129, 1967.

ZUCOLOTO, F.S. & CORDEIRO, C.R.D. Valor nutritivo de algumas variedades de feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) consumidas em Ribeirão Preto. *Ciência e Cultura*, 23:340, 1971 (Suplemento).