

FATORES ENDÓGENOS E EXÓGENOS COM INFLUÊNCIA NA
DIGESTIBILIDADE E VALOR BIOLÓGICO DAS PROTEÍNAS
DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.)

05/86

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

FATORES ENDÓGENOS E EXÓGENOS COM INFLUÊNCIA NA
DIGESTIBILIDADE E VALOR BIOLÓGICO DAS PROTEÍNAS
DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.)

ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Eng^o Industrial Químico

Orientador: Prof. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI, PhD.

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

Parcer

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Ademar Costa de Oli-
veira e aprovada pelo Conselho Julgador
em 13.03.86.*

Campinas, 13 de março de 1986.

Valdemiro C. Sgarbieri

Para Salete

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, por sua orientação dedicada e sua amizade, durante a realização do Curso.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo valioso auxílio prestado durante diversas fases desta pesquisa e pela amizade.

Aos Profs. Drs. Reynaldo Luiz Victória e Carlos Clemente Cerri, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da USP, pela supervisão dos experimentos com isótopos e determinações de nitrogênio 15 e carbono 14.

Ao Prof. Mário Queiróz Mandelli, do Instituto de Pesca, da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, pela assessoria no tratamento estatístico dos dados experimentais.

À Eng.^a Salete de Lourdes Santos de Oliveira, pela confecção das figuras a nanquim em papel vegetal.

À Técnica Sra. Luiza Pogetti Burghi, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela realização dos cortes histológicos.

À colega Sueli Aparecida Tezoto, pelas inúmeras discussões técnicas.

À Universidade Federal de Pelotas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro oferecido.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelo fornecimento das cópias da Tese.

Aos professores, funcionários e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	16
RESUMO	20
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	25
REVISÃO DA LITERATURA	27
MATERIAIS E MÉTODOS	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
APÊNDICE 1	130
APÊNDICE 2	133

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	16
RESUMO	20
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1. Breve histórico e generalidades sobre o valor nutricional de proteínas, especialmente de feijão	27
2.2. Digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>); valores aparentes e verdadeiros .	31
2.2.1. Digestibilidade <i>in vitro</i>	31
2.2.2. Digestibilidade <i>in vivo</i> e valor biológico aparentes e verdadeiros	33
2.2.3. Efeito dos fatores antinutricionais, inibidores de tripsina e hemaglutaminas, na digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	39
2.2.3.1. Inibidores de tripsina	39
2.2.3.2. Hemaglutininas	40
2.3. O emprego de isótopos no estudo do metabolismo protéico	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Materiais	47
3.1.1. Fontes protéicas	47
3.1.1.1. Feijão integral	47

3.1.1.2. Feijão integral marcado isotopicamente com nitrogênio 15 (^{15}N)	47
3.1.1.3. Extrato protéico, frações protéicas globulina e albumina, obtidos do feijão integral	47
3.1.1.4. Caseína comercial	49
3.1.1.5. Ração comercial	49
3.1.2. Animais utilizados nos ensaios biológicos	49
3.1.3. Aminoácido radioativo	49
3.1.3.1. Glicina uniformemente marcada com carbono 14, 114 mCi/mmol	49
3.1.3.2. Glicina uniformemente marcada com carbono 14, 116 mCi/mmol.	49
3.2. Métodos	50
3.2.1. Determinações químicas e bioquímicas	50
3.2.1.1. Nitrogênio	50
3.2.1.2. Proteína	50
3.2.1.3. Nitrogênio 15	50
3.2.1.4. Carbono total e radioatividade do carbono 14 (^{14}C)	50
3.2.1.5. Fibra bruta	51
3.2.1.6. Atividade de inibidor de tripsina	51
3.2.1.7. Atividade hemaglutinante	51
3.2.1.8. Digestibilidade <i>in vitro</i>	51
3.2.1.9. Determinação de aminoácidos	51
3.2.2. Obtenção das proteínas isoladas do feijão	52
3.2.3. Ensaios de modificações químicas das proteínas	53
3.2.4. Ensaios biológicos	54
3.2.4.1. Ensaios de intubação gástrica com proteínas do feijão e lectina dansiladas.....	54
3.2.4.2. Preparo das dietas	54

3.2.4.3. Determinação da digestibilidade e do valor biológico	55
3.2.4.3.1. Ensaio A	50
3.2.4.3.2. Ensaio B	60
3.2.4.3.3. Ensaio C	60
3.2.5. Tratamento estatístico	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Digestibilidade pela pepsina e pancreatina <i>in vitro</i> , atividade de inibidor de tripsina e atividade hemaglutinante das proteínas do feijão	63
4.2. Efeito das modificações químicas na digestibilidade <i>in vitro</i> e fatores antinutricionais das frações proteicas do feijão	65
4.3. Cortes histológicos do intestino delgado de ratos submetidos à intubação gástrica com proteínas do feijão e lectina dansiladas	67
4.4. Composição de aminoácidos do feijão Carioca 80 e da caseína comercial	69
4.5. Resultados obtidos no Ensaio A	73
4.6. Resultados obtidos no Ensaio B	80
4.7. Resultados obtidos no Ensaio C	94
5. CONCLUSÕES	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
APÊNDICE 1	130
APÊNDICE 2	133

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. "Pool" de aminoácidos no intestino delgado. Transcrito e traduzido de Nasset (1965) 44
- FIGURA 2. Canteiro experimental de cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca 80), marcado com nitrogênio 15 em sua proteína; feijoeiros com cerca de 20 dias após germinação 43
- FIGURA 3. Canteiro experimental de cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca 80), marcado com nitrogênio 15 em sua proteína; feijoeiros em início de floração, com cerca de 35 dias após germinação. 48
- FIGURA 4. Desenho esquemático de mucosa de intestino delgado, mostrando as vilosidades e alguns componentes de maior interesse, para estudo dos efeitos de lectinas de feijão no duodeno e jejuno de ratos. 68
- FIGURA 5. Corte histológico do duodeno de rato, 1 hora e meia após intubação gástrica com concanavalina A; vilosidades, cc-células caliciformes. HE, 111X. 70
- FIGURA 6. Corte histológico do duodeno de rato, 1 hora e meia após intubação gástrica com concanavalina A (detalhe ampliado da Fig. 5); cc-células caliciformes. HE, 220X. 70

- FIGURA 7. Corte histológico do duodeno de rato, 1 hora e meia após intubação gástrica com concanavalina A (detalhe ampliado da Fig. 6). HE, 550X. 71
- FIGURA 8. Variação do peso médio de ratos Wistar em dietas de feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*), safra da seca de 1982, cozido (○), caseína (▲), aptéica (△), e em dietas de feijão cru (⊗) e comercial (□), alternadamente, ao longo do tempo 75
- FIGURA 9. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína; vl-vilosidades, be-bordo estriado, ca-células absortivas, cc-células caliciformes, lk-glândulas de Lieberkühn, lm-lâmina própria, sm -submucosa, cm-camada muscular. HE, 87X.. 77
- FIGURA 10. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína (detalhe ampliado da Fig. 9); be-bordo estriado, cc-célula caliciforme, lm-lâmina própria, m-muco, nca-núcleo das células absortivas. HE, 220X. 77
- FIGURA 11. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína (detalhe ampliado da Fig. 9); lk-glândulas de Lieberkühn, sm -submucosa, cm-camada muscular. HE, 220X. 78

- FIGURA 12. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína; be-bordo estriado, cc-células caliciformes. PAS, 220X 78
- FIGURA 13. Corte histológico do duodeno de rato, após 23 dias em dieta de feijão cru; vl-vilosidades, lk-glândulas de Lieberkühn, lm-lâmina própria, cm-camada muscular. HE, 87X. 79
- FIGURA 14. Corte histológico do duodeno de rato após 23 dias em dieta de feijão cru (detalhe ampliado da Fig. 13); vl-vilosidade, lm-lâmina própria. HE, 282X... 79
- FIGURA 15. Corte histológico do duodeno de rato, após 23 dias em dieta de feijão cru; lk-glândulas de Lieberkühn, lm-lâmina própria, cm-camada muscular. HE, 87X ... 81
- FIGURA 16. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das urinas e a excreção urinária de carbono (mg) de ratos Wistar injetados com Gly ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína e aprotéica 84
- FIGURA 17. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das urinas e a excreção urinária de nitrogênio (mg) de ratos Wistar injetados com Gly ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína e aprotéica. 85

- FIGURA 18. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das fezes e a excreção fecal de carbono (mg) de ratos Wistar injetados com Gly ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína e aprotéica. 86
- FIGURA 19. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das fezes e a excreção fecal de nitrogênio (mg) de ratos Wistar injetados com Gly ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína e aprotéica. 87
- FIGURA 20. Regressão linear para a relação entre a digestibilidade aparente (DIG) das proteínas das dietas e a radioatividade (μCi) das fezes de ratos Wistar, previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias em dietas de caseína (\blacktriangle), feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cru (\odot) e cozido (\circ) 90
- FIGURA 21. Regressão linear para a relação entre o valor biológico aparente (VB) das proteínas das dietas e a radioatividade (μCi) das fezes de ratos Wistar, previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ^{14}C , após balanço de 4 dias em dietas de caseína (\blacktriangle), feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cru (\odot) e cozido (\circ). 91

FIGURA 22. Radioatividade acumulada (μCi) das fezes de ratos Wistar, adrede jejuados e injetados com glicina ^{14}C , ao longo de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de caseína (\blacktriangle), feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cru (\odot) e cozido (\circ). 92

FIGURA 23. Regressão exponencial para a relação entre a digestibilidade aparente (DIG) da proteína de feijão Carioca 80 (*P. vulgaris*), integral cru (\odot), cozido (\circ) e como extrato protéico cru (\bullet) e autoclavado (\oplus), e a percentagem de nitrogênio endógeno fecal (NEF) de ratos Wistar, após 4 dias de balanço. 103

FIGURA 24. Regressão logarítmica para a relação entre a digestibilidade aparente (DIG) de proteína de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, integral e como extrato protéico, cru e cozido, e a quantidade (mg) de nitrogênio endógeno fecal (NEF) real de ratos Wistar, previamente jejuados e mantidos em balanço de nitrogênio de 4 dias; feijão integral cru (\odot), feijão integral cozido (\circ), extrato protéico cru (\bullet), extrato protéico autoclavado (\oplus). 104

FIGURA 25. Regressão logarítmica para a relação entre o valor biológico aparente (VB) de proteína de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, integral cozido e como extrato protéico cru e autoclavado, e a quantidade (mg) de nitrogênio endógeno fecal (NEF) real de ratos Wistar, previamente jejuados e mantidos em balanço de nitrogênio de 4 dias; feijão integral cozido (○), extrato protéico cru (⊕), extrato protéico autoclavado (⊗). 105

FIGURA 26. Variação das percentagens de nitrogênio 15 do nitrogênio total das fezes de ratos Wistar, adrede jejuados, ao longo de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, integral e como extrato protéico, cru e cozido; as percentagens de ¹⁵N do feijão original, das dietas e natural estão indicadas pelas retas tracejadas; ⊕ -feijão cru, ○ -feijão cozido, ⊕ -extrato protéico cru, ⊗ -extrato protéico autoclavado. 107

FIGURA 27. Variação das percentagens de nitrogênio fecal de ratos Wistar, adrede jejuados, durante balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de caseína e feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*) integral e como extrato protéico, crus e tratados termicamente; ▲-caseína, ⊕ -feijão cru, ○ -feijão cozido, ⊕ -extrato protéico cru, ⊗ -extrato protéico autoclavado 108

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Formulação das dietas utilizadas nos ensaios biológicos	56
TABELA 2. Formulação da mistura salina utilizada nos ensaios biológicos, segundo Hegsted <i>et alii</i> (1941)	57
TABELA 3. Formulação da mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos, segundo Nutritional Biochemicals Corporation (1977/1978)	58
TABELA 4. Digestibilidade <i>in vitro</i> , atividade de inibidor de tripsina e de hemaglutinina, de proteínas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv. Carioca 80, em natureza e tratadas termicamente, e caseína	64
TABELA 5. Efeito da metilação redutiva e da dansilação das frações protéicas, globulina e albumina, de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv. Carioca 80, e da caseína, sobre a digestibilidade pela pepsina mais pancreatina <i>in vitro</i> , atividade antitriptica e hemaglutinante.	66
TABELA 6. Composição de aminoácidos (g/16g N) da proteína de feijão Carioca 80 (<i>Phaseolus vulgaris</i>), da caseína comercial, e do padrão de referência para proteína de alta qualidade, segundo National Research Council (1980)	72

TABELA 7. Variação de peso, digestibilidade aparente e verdadeira, em ratos Wistar, colocados em dietas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv. Carioca 80, safra da seca de 1982, caseína e aprotéica, em balanço de nitrogênio de 6 dias	74
TABELA 8. Variação de peso, digestibilidade e valor biológico, em ratos Wistar previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ^{14}C , submetidos a balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv. Carioca 80, safra de inverno de 1984, caseína e aprotéica.	82
TABELA 9. Radioatividade das fezes e urinas de ratos Wistar previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ^{14}C , colocados em balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv. Carioca 80, safra do inverno de 1984, caseína e aprotéica.	88
TABELA 10. Peso (g) e radioatividade específica das fezes ($\mu\text{Ci/g}$), em cada período de 24 horas, de ratos Wistar adrede jejuados e injetados com glicina ^{14}C , em balanço de nitrogênio de 4 dias, em dieta de caseína e feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv. Carioca 80, safra das águas de 1983.	93

TABELA 11. Variação de peso, digestibilidade e valor biológico, em ratos Wistar previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ¹⁴C, submetidos a balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, safra das águas de 1983, caseína e aprotéica 95

TABELA 12. Variação de peso, digestibilidade e valor biológico, em ratos Wistar previamente jejuados e colocados em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, caseína e aprotéica, em balanço de nitrogênio total de 4 dias 96

TABELA 13. Digestibilidade e valor biológico reais de proteína de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, obtidos através de balanço do excesso de nitrogênio 15 de 4 dias, em ratos Wistar previamente jejuados 99

TABELA 14. Contribuição percentual e quantidade de nitrogênio endógeno excretado nas fezes e urinas de ratos Wistar adrede jejuados, colocados em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, em balanço de nitrogênio de 4 dias. 100

TABELA 15. Peso e nitrogênio total de carcaças, vísceras e conteúdos gastrintestinais de ratos Wistar, ao final de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, como fonte protéica. 110

TABELA 16. Contribuição percentual e quantidade de nitrogênio oriundo do feijão em carcaças, vísceras e conteúdos gastrintestinais de ratos Wistar, ao final de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, como fonte protéica. 111

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivos estudar a influência das excreções endógenas de nitrogênio fecal e urinário, de ratos Wistar, nos cálculos da digestibilidade e valor biológico de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), bem como o efeito de fatores exógenos, como o tratamento térmico e a utilização da proteína isolada, nestas avaliações de qualidade protéica. Realizou-se tratamento térmico sob pressão, 121°C, 30 ou 40 minutos e a proteína foi extraída com NaCl 0,5M. Para se determinar a digestibilidade, utilizou-se método *in vitro*, mais particularmente, a hidrólise pela pepsina mais pancreatina, e método *in vivo*, através de balanço de nitrogênio com ratos. O valor biológico era também determinado por balanço de nitrogênio. Além de ratos normais, eram utilizados ratos marcados em suas proteínas, mediante prévia injeção intraperitoneal de solução de glicina radioativa, uniformemente marcada com carbono 14. Isto permitia comparar as excreções endógenas de nitrogênio fecal e urinário dos ratos nas diversas dietas balanceadas utilizadas, contendo feijão e caseína como fontes protéicas e aprotéica, pelas respectivas contagens de radioatividade das fezes e urinas. Foi também realizado um balanço de nitrogênio, em que o feijão usado como fonte protéica, estava marcado com 1,080% de nitrogênio 15 em excesso. Assim, através das diluições isotópicas do nitrogênio 15 nas fezes e urinas dos ratos, era possível determinar-se as excreções endógenas de nitrogênio respectivas, bem como as digestibilidades e valores biológicos corrigidos, que foram denominados reais. Encontrou-se um aumento absoluto médio de 23,6% para a digestibilidade *in vitro*, 29,4% para a digestibilidade *in vivo* real, e uma redução de 8,0% do valor bioló-

gico real das proteínas, devido ao tratamento térmico do feijão. O isolamento da proteína da farinha integral do feijão, ocasionou aumentos absolutos de 20,1%; 14,2% e 10,2%, da digestibilidade *in vitro*, *in vivo* real e do valor biológico real, respectivamente. Os ratos em dietas contendo feijão, cru ou cozido, excretaram uma quantidade de nitrogênio endógeno fecal bem mais elevada do que os em dietas de caseína e aprotéica. Em conseqüência, os valores de digestibilidade e valor biológico reais, mostraram-se superiores àqueles aparentes e verdadeiros, obtidos pelo balanço de nitrogênio total. A digestibilidade e o valor biológico aparentes da proteína do feijão, mostraram respectivamente, correlação negativa forte ($r=-0,9621$, $P<0,01$) e moderada ($r=-0,7979$, $P<0,01$), com a quantidade de nitrogênio endógeno fecal excretada pelo rato. As quantidades de nitrogênio endógeno urinário excretadas não diferiram ($P<0,05$) para os ratos nas diversas dietas. Chegou-se, portanto, às seguintes conclusões básicas: 1) o tratamento térmico do feijão, quer sob forma integral ou de extrato protéico, ocasionou um aumento da digestibilidade e uma redução do valor biológico das proteínas; 2) o isolamento da proteína da farinha integral do feijão, melhorou sua digestibilidade e valor biológico, inferindo-se que existem substâncias no feijão, de provável natureza não-protéica, capazes de interagirem com as suas proteínas ou as enzimas proteolíticas, além de interferirem ao nível de metabolismo intermediário; 3) a maior quantidade de nitrogênio endógeno fecal excretada por ratos em dietas de feijão e caseína, com relação àqueles em dieta aprotéica, invalida o uso desta para o cálculo da digestibilidade e valor biológico verdadeiros; as lectinas ativas, pela sua ação de ulceração das vilosidades intestinais, parecem constituir a principal causa da grande excreção nitrogenada fecal de origem endógena, em ratos nas dietas contendo feijão cru como fonte protéica; 4) a excreção fecal de ni-

trogênio endógeno, constitui um importante fator de redução indireta da digestibilidade e valor biológico aparentes das proteínas do feijão, inferindo-se que os métodos convencionais de cálculo subestimam estes índices de qualidade protéica, especialmente no caso de feijão cru.

ABSTRACT

ENDOGENOUS AND EXOGENOUS FACTORS AFFECTING DIGESTIBILITY AND BIOLOGICAL VALUE OF BEAN (*Phaseolus vulgaris*, L.) PROTEINS.

The present work aimed to establish the influence of fecal and urinary endogenous nitrogen excretion on the digestibility and biological value of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) proteins, using Wistar rats as experimental animals. The influence of exogenous factors such as heat treatment and isolation of proteins were also studied. The proteins were extracted in 0.5 M NaCl and heat treatment was at 121°C for 30 or 40 minutes. Digestibility was performed *in vitro* (pepsin plus pancreatin) and *in vivo*. *In vivo* digestibility and biological value were determined in normal rats and in rats labeled with glycine - ^{14}C . The labeling of the rats with ^{14}C permitted comparison of the contribution of endogenous nitrogen in the feces and urine of rats on diets containing raw beans, cooked beans, and casein, as well as on protein-free diet. Beans labeled with ^{15}N (1.080% in excess) were obtained by $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fertilization of the bean plants. Isotopic (^{15}N) dilution in the rat feces and urine permitted the determination of digestibility and biological value free from interference by endogenous nitrogen ("real" digestibility and biological value). The heat treatment caused an absolute medium improvement on bean protein digestibility *in vitro* of 23.6% and of 29.4% on real digestibility. The effect of heat on real biological value of bean protein was deleterious, decreasing it about 8.0%. The measured improvement of the isolation of the bean protein on its digestibility *in vitro*, real digestibility and real biological value was 20.1%, 14.2% and 10.2%, respectively. The

rats on diets containing bean showed a much higher excretion of endogenous fecal nitrogen, as compared with those on casein or protein-free diets. In consequence, the real digestibility and biological value of bean protein, based on ^{15}N -excess balance, were higher than the apparent and true values, based on total nitrogen balance. The amount of endogenous urinary nitrogen excreted by the rats on the various protein sources was not statistically different ($P < 0.05$). A strong negative correlation ($r = -0.9621$, $P < 0.01$) was found between apparent digestibility of bean protein and fecal endogenous nitrogen excreted by the rats, and a moderate negative correlation ($r = -0.7979$, $P < 0.01$) between apparent biological value and fecal endogenous nitrogen. The data outlined permitted drawing the following conclusions: 1) heat treatment of the whole beans and of the isolated protein, improved considerably the protein digestibility and slightly decreased the biological value; 2) isolation of the protein improved both digestibility and biological value, suggesting the existence, in the whole beans, of substances, non-protein in nature, which interfere with protein digestion and utilization; 3) the higher excretion of endogenous fecal nitrogen by rats on diets containing bean protein or casein, as compared with the protein-free diet, invalidate the use of a protein-free diet for the calculation of true digestibility; the villi disruption caused by the bean lectins seems to be the main factor that causes the very high excretion of fecal endogenous nitrogen of rats fed on diets containing raw beans; 4) the high excretion of fecal endogenous nitrogen by the rats on diets containing beans or bean proteins contribute significantly to lowering the apparent digestibility and biological value of bean protein, particularly if unheated.

1. INTRODUÇÃO

O feijão, planta leguminosa da família das papilionáceas, é a base da alimentação protéica popular no Brasil. É originário da Ásia tropical e da América Latina, mais particularmente dos planaltos do México e da Guatemala, do Peru, montanhas do norte ocidental da Argentina e do pantanal do Mato Grosso, no Brasil. Durante muito tempo, acreditou-se que o feijão era originário da Índia, devido a que sua introdução na Europa, ocorreu após as grandes descobertas marítimas dos séculos XV e XVI. Entretanto, determinações de carbono radioativo em vagens e sementes encontradas por arqueólogos em túmulos astecas e incaicos, mostraram que o cultivo de feijão já era conhecido na América há milhares de anos, e em Tehuacân, no México, há 7000 anos (Kaplan, 1965).

O Brasil aparece como o país onde a produção e o consumo de feijão é dos maiores do mundo. A Food and Agricultural Organization, FAO, (1971) informa um consumo de 66 gramas por dia *per capita*, que é elevado, ainda mais comparando-se com o consumo do México, país tradicionalmente produtor e consumidor de feijão, que é de 49 gramas por dia *per capita*. Tal fato é ratificado pelos resultados encontrados pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, (1977), de que o feijão, considerando-se os alimentos isolados, constitui a maior fonte de proteína consumida em todas as regiões do Brasil, com exceção da formada pelos estados do Centro-Oeste e Norte, onde a maior fonte é a carne bovina. O consumo apresenta variabilidade, sendo nestes estados das regiões Centro-Oeste e Norte, de 8,93 gramas de proteína de feijão/dia.habitante e na região Nordeste, 19,09 gramas/dia.habitante. Esta variação no consumo já havia sido constatada por Dutra de Oliveira e de Souza,

em 1973, *apud* Tobin e Carpenter (1978). Considerando-se todo o território brasileiro, o feijão contribui com um valor médio, entre as regiões definidas pelo IBGE, de $21,0 \pm 5,8\%$ da proteína consumida, seguido da carne bovina, com $14,3 \pm 4,5\%$ e do arroz, com $13,7 \pm 3,0\%$, os dois últimos alimentos alternando-se no 2º e 3º lugar, para as diversas regiões.

Apesar do exposto e do feijão ser considerado uma boa fonte de proteína, em termos quantitativos, podendo variar entre 15,9 e 37,8%, com uma média de 24,0% de proteína bruta ($N \times 6,25$) em base seca (Tobin e Carpenter, 1978), o valor nutricional destas proteínas é relativamente baixo, quando comparado àquele de proteínas de origem animal. As causas deste baixo valor nutricional têm sido atribuídas principalmente à deficiência de aminoácidos sulfurados, mais particularmente metionina, agravada pela sua baixa disponibilidade biológica, e à baixa digestibilidade (Sgarbieri e Whitaker, 1982). Entretanto, um fato inerente ao feijão, como o de provocar perdas de nitrogênio endógeno em ratos, mesmo em estado cozido (Bender e Mohammadiha, 1981), e seu possível efeito indireto nos cálculos da digestibilidade e do valor biológico, ainda não está esclarecido. Visando estudar este efeito, como também verificar ou mesmo ratificar outros fatores influentes na digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L) mais divulgados na literatura, como o tratamento térmico e o isolamento da proteína, é que realizou-se este trabalho. Para tal utilizou-se, além de métodos convencionais para avaliação destes índices, como a hidrólise enzimática *in vitro*, o balanço de nitrogênio com ratos e determinações químicas auxiliares, métodos não convencionais, como a marcação isotópica das proteínas do feijão e do rato.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Breve histórico e generalidades sobre o valor nutricional de proteínas, especialmente de feijão

Aspectos históricos sobre digestão de proteínas e a importância dos aminoácidos em nutrição, já foram objeto de amplas revisões de literatura (Greenstein e Winitz, 1961; Rogers e Harper, 1966). Na Grécia antiga, Hipócrates (460 a.C. - 377 a.C.), concluiu, de forma filosófica, que os princípios alimentares nutritivos eram absorvidos como um todo e deveriam, tanto os do reino animal como os do reino vegetal, ser os mesmos, baseado no fato de que os animais herbívoros formavam carne corpórea. Esta última conclusão, de certa forma aplicável às proteínas, num passado remoto e distante 19 séculos da sua descoberta, era conseguida por método de analogia, descrito por Pappus (1984). A natureza química dos alimentos e seu processo digestivo continuaram desconhecidos durante séculos, mesmo até a época do alquimista Paracelso (1493-1541). Este, embora contrário às teorias da medicina de Galeno (131-200), seguidor de Hipócrates e cuja doutrina perdurou até o século 18, acreditava, como a doutrina Galênica, que a digestão dos alimentos era um processo de putrefação, que forneceria energia a certas "forças ou fluidos vitais" do corpo, para separarem a porção nutritiva do alimento daquelas a serem excretadas. Somente 3 séculos após, o químico alemão Liebig (1803-1873), estabeleceu a divisão dos alimentos em três constituintes fundamentais: glicídeos, lipídeos e protídeos. Entretanto, ainda acreditava que as proteínas eram absorvidas pelo organismo intatas e não como seus produtos de degradação. Neste mesmo século, Young em 1803, *apud* Rogers e Harper

(1966), demonstrou que sementes quebradas de feijão, colocadas no estômago de rã, liquefaziam-se e desapareciam num período de 3 dias, contrariando o pensamento da época, de que os sucos gástricos não digeriam certos vegetais. É bem provável que este ensaio tenha sido um dos pioneiros em digestibilidade do feijão. Em 1806, Prausnitz, *apud* Pittman (1932), determinou a digestibilidade de feijão (*Phaseolus vulgaris*), utilizando um homem cuja dieta consistia de 500 gramas de feijão e 1 litro de cerveja diários, durante três dias, encontrando um valor de cerca de 70%. Talvez o primeiro ensaio em necessidade nutricional de proteínas foi realizado 10 anos depois, em 1816, por Magendie, *apud* Greenstein e Winitz (1961), que verificou que cães alimentados com uma dieta sem nitrogênio, morriam em pouco tempo e que a adição de materiais protéicos a esta dieta, preveniam a mortalidade. Segundo ainda os mesmos autores foi Abderhalden, em 1907, realizando estudos de balanços de nitrogênio em cães, com dietas cujas fontes protéicas eram carne de cavalo, em natureza e completamente hidrolisada por pepsina, tripsina e erepsina, que demonstrou a necessidade nutricional dos aminoácidos e não das proteínas intatas. Posteriormente, Van Slyke e Meyer (1913), injetando uma solução de aminoácidos, obtidos pela hidrólise da caseína, em um cão, provaram que os aminoácidos, ao passarem para a circulação, eram absorvidos pelos diversos tecidos do cão, sem sofrerem alterações químicas e por processo não-osmótico. Mais recentemente, Jacobs (1965) demonstrou que os aminoácidos podem ser absorvidos contra um gradiente de concentração, formado entre os conteúdos do lúmen intestinal e o plasma sanguíneo de ratos, e que também apresentam um fluxo dinâmico bidirecional através da mucosa intestinal.

As proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram inicialmente estudadas, quanto a sua solubilidade e composição elemen

tar, por Ritthausen, em 1883-84, *apud* Osborne (1894), que salientou o baixo teor de enxofre destas proteínas. Ritthausen conseguiu identificar dois tipos de proteínas no feijão. Uma existente em maior quantidade, com propriedades de uma globulina, e uma outra de caráter não-definido. Osborne *op. cit* continuou estes estudos, realizando dezenas de extrações das proteínas de feijão em soluções de cloreto de sódio de diferentes concentrações, seguidas de precipitação com sulfato de amônio e/ou diálise. Concluiu que o feijão continha dois tipos de globulina, solúveis em soluções salinas diluídas e precipitáveis com ácidos. Denominou a mais abundante, perfazendo cerca de 20% das sementes e correspondente àquela encontrada por Ritthausen, de faseolina e a outra bem mais solúvel, de "phaselin".

Alguns dos primeiros resultados de ensaios com vistas a avaliar o valor nutritivo das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), mais particularmente da faseolina e da farinha integral, foram obtidos por Osborne e Mendel, em 1919, e cedidos para publicação a Johns e Finks (1920). Aqueles pesquisadores verificaram que ratos perdiam peso rapidamente e alguns morriam, quando colocados em dietas contendo faseolina crua como fonte protéica. Ao serem colocados em dietas de caseína, o crescimento tornava-se normal. Entretanto, todos os ratos colocados em dietas contendo farinha integral de feijão cru, morriam rapidamente. Um cozimento por curto tempo, tanto da faseolina como da farinha integral, já evitava a mortalidade e os ratos apresentavam um pequeno crescimento. A adição de 2% de cistina à faseolina crua também proporcionava um pequeno crescimento aos ratos. A mesma suplementação com 2% de cistina à faseolina e à farinha integral de feijão cozidas, relativa ao seu teor protéico, ocasionava um crescimento normal dos ratos, mas inferior aos em dieta de caseína. Foram também Osborne e Mendel

(1919), que aprimoraram as técnicas de ensaios nutricionais de proteínas, pela utilização do rato albino e do uso racional de misturas salinas e vitamínicas suplementares. Seu método de avaliação da qualidade protéica, o "quociente de eficiência protéica" (Protein Efficiency Ratio, PER) entre o ganho de peso e a proteína ingerida, foi posteriormente adotado como método oficial da Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1975).

O "valor biológico" de uma proteína, obtido através de balanço de nitrogênio e definido primeiramente por Karl Thomas, s. d., *apud* Mitchell (1923-24), como a percentagem do nitrogênio absorvido que era retida pelo corpo para a manutenção e formação dos tecidos, foi amplamente estudado por Mitchell *op. cit.*. Este pesquisador encontrou um valor de 38,4% para as proteínas de feijão cozido (*Phaseolus vulgaris*) e de 84,7% para as do leite, obtidos utilizando ratos em dietas contendo 10% de proteína (Mitchell, 1924). O método de Mitchell para a determinação do valor biológico de proteínas é, atualmente, largamente utilizado. O baixo valor biológico encontrado para as proteínas do feijão, era atribuído a uma deficiência de cistina e Pittman (1932) suplementou feijão com 2% de cistina com relação à proteína, utilizando-o como única fonte protéica em dietas para balanço de nitrogênio realizado com cinco mulheres adultas. O autor observou que as mulheres que consumiram feijão não suplementado, preparado como purê ou apenas cozido, apresentaram balanço de nitrogênio negativo após 10 dias e a suplementação praticamente não alterou este quadro. Na verdade, desconhecia-se na época a essencialidade da metionina, principal aminoácido limitante em feijão (Baldi e Salamini, 1973; Jaffé e Brücher, 1974) que só foi demonstrada após 5 anos, por Womack *et alii* (1937). Pittman (1932) encontrou uma percentagem média de digestibilidade

aparente para o feijão de 65,9%, variando entre 57,0 a 77,0%. Mitchell (1924) encontrou uma digestibilidade verdadeira, *i.e.*, corrigida através do nitrogênio metabólico das fezes, de 76,0% para o feijão.

Existem, atualmente, dezenas de métodos para avaliação da qualidade protéica (The United Nations University, 1980). Entretanto, pode ser ressaltado o fato de que somente os métodos do quociente de eficiência protéica (PER) e o da digestibilidade pela pepsina de Elmslie (1958) para rações protéicas de origem animal, constituem métodos oficiais da AOAC (1975). Com relação a recomendações dietéticas atinentes à proteínas e aminoácidos, a Academia Nacional de Ciências, Washington, D.C., EUA, publica, desde 1943 e, regularmente, em intervalo de cerca de 5 anos, uma publicação contendo tais recomendações (National Research Council, NRC, 1980).

2.2. Digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*): valores aparentes e verdadeiros

2.2.1. Digestibilidade *in vitro*

Os resultados de digestibilidade da faseolina *in vitro* obtidos por Waterman e Johns (1921) foram dos primeiros a serem relatados. Estes pesquisadores utilizaram uma digestão pela pepsina, seguida de outra com tripsina, obtendo valores baixos de 21,2% a 29,2%, para a faseolina crua e de 34,7% a 40,7% para a faseolina cozida. Assim, os experimentos indicaram que o cozimento em água fervente, tornava a faseolina mais digerível. A maneira utilizada pelos autores para o cálculo da digestibilidade é atualmente de uso generalizado. Consiste na determinação da percentagem do nitro

gênio da amostra que foi digerida pelo sistema enzimático utilizado, corrigida pelo nitrogênio produzido pela autodigestão do sistema enzimático. Os autores recomendaram ainda a correção, tanto do nitrogênio total, como do nitrogênio digerido, com o nitrogênio originalmente solúvel da amostra. A fórmula para o cálculo ficaria:

$$\text{Digestibilidade} = \frac{\text{Nd} - \text{Nb} - \text{Ns}}{\text{Nt} - \text{Ns}} \times 100$$

Onde: Nt = mg N total do amostra; Nd = mg N do digerido;

Nb = mg N produzido pela autodigestão do sistema enzimático;

Ns = mg N originalmente solúvel da amostra.

Mais recentemente, Romero e Ryan (1978) estudaram a suscetibilidade à hidrólise enzimática *in vitro* da globulina G1, proteína de reserva mais abundante no grão de feijão, pela ação das enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina. A suscetibilidade à hidrólise desta proteína representava 12 a 15% daquela da albumina de soro bovina, para as três enzimas utilizadas. O tratamento térmico ocasionou um aumento bem maior da hidrólise da proteína G1 pelas três enzimas, quando comparado àquele da albumina de soro bovino. Os autores concluíram que a resistência à hidrólise da globulina G1, era devida à existência de um número relativamente grande de peptídeos resistentes à ação da tripsina e de impedimentos à hidrólise pela própria conformação da molécula nativa. Liener e Thompson (1980) confirmaram estes resultados, verificando que a fração protéica G1 nativa, virtualmente isenta de atividade antitriptica, apresentava uma hidrólise enzimática bem inferior a da caseína e que o tratamento térmico ocasionava um aumento marcante nas hidrólises pelas três enzimas, pepsina, tripsina e quimotripsina, tornando-as

comparáveis àquelas da caseína.

Em se tratando de farinha integral de feijão, Sgarbieri *et alii* (1979) encontraram um aumento absoluto de cerca de 21% na digestibilidade das proteínas pela pepsina mais pancreatina, ao submeter 4 variedades de *Phaseolus vulgaris* à autoclavagem por 15 min a 121°C. As variedades cruas apresentaram um valor médio de 43,3% e as autoclavadas de 64,7%.

Assim como ficou claro, pelo exposto, que o tratamento térmico exerce um efeito benéfico nos valores de digestibilidade *in vitro* das proteínas de feijão, Sgarbieri e Whitaker (1982), informam que o isolamento da proteína da farinha integral, ocasiona também um aumento da digestibilidade. Os autores verificaram que o isolado protéico total, a fração globulina e a fração albumina da variedade Rosinha G2, em natureza, apresentaram valores de digestibilidade de 52,0, 67,0 e 46,0%, respectivamente, contra 27,5% para a farinha integral.

2.2.2. Digestibilidade *in vivo* e valor biológico aparentes e verdadeiros.

A digestibilidade aparente representa a percentagem do nitrogênio ingerido que foi absorvido pelo trato gastrintestinal e é calculada a partir da fórmula (Wolzak *et alii*, 1981):

$$\text{Digestibilidade aparente} = \frac{\text{Ni} - \text{Nf}}{\text{Ni}} \times 100$$

Sendo: Ni = nitrogênio ingerido e Nf = nitrogênio fecal.

A digestibilidade verdadeira também representa a percen-

tagem do nitrogênio ingerido que foi absorvido pelo trato gastrin-
testinal, com a diferença de que o nitrogênio fecal é corrigido pe-
lo nitrogênio endógeno fecal, sendo calculada através da fórmula
(Liener e Thompson, 1980):

$$\text{Digestibilidade verdadeira} = \frac{\text{Ni} - (\text{Nf} - \text{Nef})}{\text{Ni}} \times 100$$

Sendo: Ni = nitrogênio ingerido, Nf = nitrogênio fecal e
Nef = nitrogênio endógeno fecal.

O valor biológico aparente é uma medida do nitrogênio re-
tido para o crescimento e manutenção, sendo expresso pela percenta-
gem do nitrogênio absorvido que foi retido e calculado pela fórmu-
la (Pike e Brown, 1967):

$$\text{Valor biológico aparente} = \frac{\text{Ni} - \text{Nf} - \text{Nu}}{\text{Ni} - \text{Nf}} \times 100$$

Onde: Ni = nitrogênio ingerido, Nf = nitrogênio fecal e
Nu = nitrogênio urinário.

O valor biológico verdadeiro é também representado pela
percentagem do nitrogênio absorvido que foi retido, em que os ni-
trogênios fecais e urinários são corrigidos pelas respectivas ex-
creções de nitrogênio endógeno. A fórmula para o cálculo (Pike e
Brown, 1967) ficaria:

$$\text{Valor biológico verdadeiro} = \frac{\text{Ni} - (\text{Nf} - \text{Nef}) - (\text{Nu} - \text{Neu})}{\text{Ni} - (\text{Nf} - \text{Nef})} \times 100$$

Onde: Ni = nitrogênio ingerido, Nf = nitrogênio fecal,
Nu = nitrogênio urinário, Nef = nitrogênio endógeno fecal e
Neu = nitrogênio endógeno urinário.

Tanto a digestibilidade como o valor biológico aparentes de uma proteína podem ser determinados através de um balanço de nitrogênio, em que a proteína seja a única fonte protéica da dieta balanceada. Entretanto, a determinação da digestibilidade e valor biológico verdadeiros, apresenta séria dificuldade, qual seja, a quantificação das excreções de nitrogênio endógeno fecal e urinário. Mitchell (1923-24) já citava (tradução):

"A determinação da quantidade de proteína digerida e absorvida de uma dada ingestão protéica é complicada, pela dificuldade de distinguir entre o material fecal proveniente do alimento e aquele proveniente do trato intestinal e suas secreções".

"A determinação da quantidade de nitrogênio resultante do catabolismo dos produtos finais da digestão da proteína da dieta é complicada, pelo fato de que a urina contém substâncias nitrogenadas resultantes do catabolismo dos tecidos corporais, além dos produtos finais nitrogenados do catabolismo da proteína da dieta".

O autor concluiu que tanto o nitrogênio endógeno fecal, como o nitrogênio endógeno urinário de ratos, poderiam ser determinados colocando os animais em dieta livre de nitrogênio e medindo as excreções totais respectivas. Assim procedendo, encontrou uma digestibilidade aparente de 61% e uma verdadeira de 76% para as proteínas de feijão, em concentração de 5% na dieta. Posteriormente, Mitchell e Carman (1926), ao estudarem o valor biológico de misturas de farinha de trigo com diversas proteínas animais na proporção 2:1, verificaram que o uso de uma dieta contendo de 0,60 a 0,75% de nitrogênio de ovo integral era preferível ao uso de uma

dieta aprotéica, para determinação dos nitrogênios metabólicos. Entretanto, Bosshardt e Barnes (1946) demonstraram que tanto dieta aprotéica como de baixo teor protéico, não eram seguras para a determinação do nitrogênio metabólico fecal. Estes autores propuseram um método gráfico para esta determinação, levando em conta a ingestão de nitrogênio, em diferentes níveis protéicos e a excreção de nitrogênio fecal, ambos considerados por unidade de dieta consumida. Snook e Meyer (1964) observaram que dietas contendo proteína, ocasionavam um aumento da atividade de enzimas digestivas e do conteúdo de nitrogênio endógeno no intestino delgado de ratos, quando comparadas com a dieta aprotéica. Não obstante tais resultados, a dieta aprotéica vem sendo ainda utilizada com vistas à determinação dos nitrogênios endógenos, inclusive havendo-se encontrado regressões matemáticas entre estes e o peso corporal ou metabólico ($\text{Kg}^{0,73}$), a ingestão de dieta e o peso das fezes de ratos, que possibilitam sua determinação por simples cálculo (Causeret *et alii*, 1965; Araya *et alii*, 1974).

No caso particular de proteínas de feijão, a determinação da digestibilidade e valor biológico verdadeiros, *i. e.*, corrigidos com os nitrogênios metabólicos obtidos pela utilização de uma dieta aprotéica, apresenta ainda maiores dificuldades. Tal fato deve-se a que existem evidências de que o feijão exerce um forte estímulo à excreção endógena de nitrogênio em ratos, quer em estado cru, sob forma integral (Pion *et alii*, 1979), lectinas isoladas (Pusztai *et alii*, 1981) ou de proteína de reserva mais importante, glicoproteína II (Sgarbieri *et alii*, 1982a), quer em estado integral cozido (Bender e Mohammadiha, 1981).

A literatura existente sobre digestibilidade *in vivo* e valor biológico de feijão cru como única fonte protéica na dieta é escassa, devido à dificuldade de realização dos ensaios, ocasio-

nada pela toxidez do feijão cru (Jaffé, 1950). Kakade e Evans (1966) encontraram um valor de digestibilidade de 43,5% para a variedade Sanilac e Pusztai *et alii* (1979a) de 31% para a digestibilidade e cerca de 32% para o valor biológico, utilizando o cultivar Pinto III.

Em se tratando de feijão cozido, a situação é bem diferente, existindo muitas informações na literatura, com relação à digestibilidade e valor biológico. A revisão de Tobin e Carpenter (1978), encontrou um valor médio de 77%, com uma variação de 65 a 88%, para a digestibilidade e de 64%, com uma variação de 44 a 68%, para o valor biológico. As médias foram calculadas a partir de 28 referências bibliográficas, entre os anos de 1946 a 1975. Estes autores apresentam diversas razões possíveis para a digestibilidade relativamente baixa das proteínas de feijão, quais sejam, entre outras: resistência natural à proteólise pelas enzimas digestivas; presença de carboidratos indigeríveis no íleo e no intestino grosso, ocasionando fermentações, cujos produtos causariam irritações às paredes intestinais, estimulando o peristaltismo com uma conseqüente descarga mais rápida e digestão menos eficiente; estes carboidratos poderiam também ocasionar um aumento da contagem de bactérias e de conseqüente proteína bacteriana nas fezes, reduzindo indiretamente os valores da digestibilidade. Neste sentido, Wilson *et alii*. (1980) observaram um aumento das contagens de coliformes, mais particularmente de *Escherichia coli*, no intestino delgado de rates alimentados com dieta de feijão do cultivar Processor, com relação à dieta de caseína. O aumento destes microorganismos foi atribuído à ação de agregação e eliminação de linhagens bacterianas competitivas, como Gram-positivas e cocos, ocasionada pelas lectinas existentes no feijão. No entanto, Bender e Mohammadiha (1981) realizaram contagens de bactérias viáveis nas fezes, deter-

minações de ácido desoxirribonucléico (DNA) em *Escherichia coli* e nas células descamadas da mucosa intestinal, verificando que o DNA proveniente da flora bacteriana perfazia apenas 9 a 10% do total excretado no caso de ratos em dietas de feijão. Este resultado levou os autores a sugerirem que a ingestão de feijão, provocava um aumento marcante na renovação das células da mucosa intestinal e que a baixa digestibilidade do feijão, poderia não ser devida à absorção deficiente, mas a maior perda de nitrogênio endógeno.

O baixo valor biológico das proteínas de feijão deve-se, principalmente, à composição de aminoácidos, que é deficiente nos sulfurados, metionina, cisteína e cistina (Sgarbieri e Whitaker, 1982). A relação entre o valor biológico de uma proteína e a percentagem de déficit do aminoácido essencial limitante, com relação à proteína do ovo integral, foi determinada por Mitchell e Block (1946), sendo definida pela equação, $y=102-0,634x$, com $r_{x.y}=-0,861$, onde y representa o valor biológico (%), x o déficit do aminoácido essencial limitante (%) e $r_{x.y}$ o coeficiente de correlação entre x e y . Tobin e Carpenter (1978) encontraram uma média de 1,2g/100g e de 0,9g/100g de proteína de feijão, de metionina e de cisteína ou cistina, respectivamente, entre 47 referências bibliográficas, de 1946 a 1975. Estas percentagens somadas representam aproximadamente 80% daquela de 2,6g/100g, estimada pelo NRC (1980) para o total dos aminoácidos sulfurados de proteínas de alta qualidade. Outro fator importante relacionado com o valor biológico das proteínas do feijão é a disponibilidade biológica da metionina, que é o real aminoácido limitante, sabendo-se que a cisteína ou cistina são formadas às suas expensas (Kakade, 1974; Sgarbieri e Whitaker, 1982). Sgarbieri *et alii* (1979) encontraram biodisponibilidades de metionina baixas para variedades brasileiras de feijão, de 29,3% para a variedade Carioca a 40,6% para a Rico 23. No tocante à influên

cia da maior excreção de nitrogênio endógeno, devido a ingestão de feijão, no cálculo do valor biológico, nada se pôde ter às mãos.

2.2.3. Efeito dos fatores antinutricionais, inibidores de tripsina e hemaglutininas, na digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Tais efeitos dizem respeito somente a feijão em estado cru, pois é fato sabido que tratamentos térmicos adequados inativam completamente as atividades antitripticas e hemaglutinantes, ou reduzem-nas a valores residuais muito baixos (de Muelenaere, 1965; Antunes e Sgarbieri, 1980). Entretanto Bender e Reaidi (1982) informam que, em 1981, houve a ocorrência de 25 casos oficiais de intoxicação alimentar na Grã-Bretanha, envolvendo cerca de 100 pessoas, devido à ingestão de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cru ou mal-cozido. O fato foi divulgado num programa de televisão da British Broadcasting Corporation (BBC), que recebeu 355 cartas relatando casos similares de intoxicação por feijão, envolvendo 870 pessoas, tendo a maioria dos casos ocorrido nos anos de 1980 e 1981.

2.2.3.1. Inibidores de tripsina

Embora a composição e as propriedades químicas, físicas e fisiológicas dos inibidores existentes em leguminosas sejam bem conhecidas (Kunitz, 1946; Liener, 1976; Liener 1979, Sgarbieri e Whitaker, 1982), sua influência sobre a digestibilidade das proteínas do feijão ainda não está bem esclarecida. Jaffé (1950), ao determinar o aumento da digestibilidade verdadeira de sementes de leguminosas devido à autoclavagem, verificou que aquelas espécies, incluindo *Phaseolus vulgaris*, que apresentavam o maior aumento, possuíam também a maior atividade antitriptica medida *in vitro* quando

em estado nativo. Por outro lado, Sgarbieri (1980) não encontrou correlação significativa entre a digestibilidade *in vitro* e a atividade de inibidor de tripsina, para sementes cruas de leguminosas, algumas da espécie *Phaseolus vulgaris*.

Com relação ao valor biológico, Kakade (1974) informa que, embora os inibidores de tripsina representem apenas 2,5% da proteína do feijão "Navy" (*P. vulgaris*), contribuem com 40% da cistina total da proteína e são muito resistentes à hidrólise enzimática, devido ao grande número de ligações dissulfídicas da molécula. Este aspecto tornaria sua cistina não-disponível em grande parte, reduzindo o valor biológico do feijão. Outro efeito do inibidor de tripsina a ser considerado seria o de causar hipertrofia pancreática, acompanhada de um aumento da secreção de enzimas pancreáticas, como tripsina e quimotripsina, ricas em aminoácidos sulfurados, o que representaria uma perda e acentuaria ainda mais a deficiência destes aminoácidos no feijão (Liener, 1979).

2.2.3.2. Hemaglutininas

As hemaglutininas ou lectinas são proteínas capazes de se ligar às superfícies celulares, via oligossacarídeos específicos, e já foram objeto de diversas revisões de literatura (Jaffé, 1969, Liener, 1974; Simpson *et alii*, 1978; Sgarbieri e Whitaker, 1982). Com relação a influência das hemaglutininas da espécie *Phaseolus vulgaris* em seu valor nutricional, a maioria dos trabalhos existentes são referentes a sua toxidez e modo de ação quando em estado nativo (Jaffé e Camejo, 1961; Jaffé e Brücher, 1972; Pusztai *et alii*, 1975; Pusztai e Palmer, 1977; Pusztai *et alii*, 1979a; Pusztai *et alii*, 1979b; King *et alii*, 1980a; King *et alii*, 1980b; Wilson *et alii*, 1980; Pusztai *et alii*, 1981; Miyoshi *et alii*, 1982;

Bender e Reaidi, 1982; Figueroa *et alii*, 1984). No tocante aos efeitos sobre a digestibilidade e o valor biológico, Pusztai *et alii* (1975) encontraram uma correlação negativa com $r=-0,890$ ($P<0,001$) entre a percentagem de lectina adicionada à dieta, sob forma de frações protéicas de feijão, globulina e albumina, e a utilização líquida de proteína (Net Protein Utilization, NPU, que pode ser determinada pelo produto digestibilidade x valor biológico e representa a percentagem do nitrogênio ingerido que foi retida pelo animal) de caseína, a nível de 5% da dieta. Posteriormente, Pusztai e Palmer (1977) isolaram lectinas de feijão com 95% de pureza por cromatografia de afinidade e realizaram trabalho semelhante com este material, encontrando correlação semelhante, definida pela equação, $NPU = NPU_{5\% \text{ caseína}} - 280x$, sendo x o conteúdo de lectina em percentagem da dieta (p/p). Sgarbieri *et alii* (1982b) verificaram que a adição de 0,5% de lectina extraída do feijão Rosinha G-2, à proteína de uma dieta balanceada contendo 10% de caseína como fonte protéica, reduzia a digestibilidade e o valor biológico da caseína, de 94,1 para 88,0% e 84,2 para 74,1%, respectivamente. Pelos trabalhos de Pusztai *et alii* (1979b) e de King *et alii* (1980a), pode-se inferir que esta redução da digestibilidade poderá ser devida, em parte, a uma redução indireta, pelo aumento de material celular nitrogenado nas fezes dos ratos, resultante da ulceração das microvilosidades intestinais pela ação das lectinas do feijão.

2.3. O emprego de isótopos no estudo do metabolismo protéico

O estudo do metabolismo protéico utilizando aminoácidos marcados isotopicamente, foi extensamente realizado por Schoenheimer *et alii* (1939). Neste trabalho, que fazia parte de uma notável série, intitulada "Estudos em metabolismo protéico", estes autores utilizaram L(-)-leucina marcada com deutério e nitrogênio 15. Ministraram a leucina isotópica, numa quantidade equivalente a 23 mg diários, a ratos adultos mantidos por 3 dias em dieta de caseína, após os quais mantiveram seus pesos constantes. Da leucina ingerida, 2,1% foi encontrada nas fezes, 27,6% na urina, 57,5% nas proteínas e 7,8% nas frações não-protéicas. Além da leucina, todos os aminoácidos isolados, com exceção da lisina, continham nitrogênio marcado. Na verdade, somente 1/3 deste nitrogênio estava presente na leucina corporal, estando os 2/3 restantes presentes em outros aminoácidos. Os autores concluíram, com relação ao conceito vigente na época relativo às fontes de nitrogênio urinário, exógena (dieta) e endógena (corporal), o seguinte (tradução):

"É difícil conciliar nossos resultados com qualquer teoria que requeira uma distinção entre estes dois tipos de nitrogênio. Foi demonstrado que os grupamentos nitrogenados das proteínas teciduais estão constantemente envolvidos em reações químicas; as ligações peptídicas abrem, os aminoácidos liberados misturam-se a outros do mesmo tipo e de qualquer fonte, dieta ou tecido. Esta mistura de moléculas de aminoácidos, enquanto em estado livre, toma parte numa variedade de reações químicas: alguns tornam a entrar diretamente em posições vagas deixadas abertas pela ruptura das ligações peptídicas; outros transferem seu nitrogênio para moléculas desaminadas para formar novos aminoácidos. Estes, por sua vez, entram continuamente nos mesmos ciclos químicos, que resti-

tuem a fonte de nitrogênio indistinguível. Alguns constituintes corporais, como os ácidos glutâmico e aspártico, e certas proteínas como as do fígado, soro e outros órgãos, estão mais envolvidos do que outros neste complexo processo metabólico geral. O nitrogênio excretado pode ser considerado como parte do "pool" metabólico originário da interação do nitrogênio da dieta com relativamente grandes quantidades de nitrogênio tecidual reativo".

Posteriormente, Nasset (1965) ampliou o conceito deste "pool" metabólico também ao nível de digestão e absorção protéica no intestino delgado, verificando que a hidrólise da mistura protéica, dietética e endógena, no lúmen intestinal, fornece um "pool" de aminoácidos com relações molares relativamente constantes, independente do alimento ingerido. Isto faria com que não ocorressem grandes variações no sortimento de aminoácidos disponíveis para absorção, contribuindo para uma melhor eficiência protéica. O "pool" de aminoácidos está esquematizado na Figura 1. Em trabalho anterior, Nasset e Ju (1961) haviam ministrado dietas contendo caseína marcada com carbono 14 para cães e ratos, visando determinar a proporção entre nitrogênio endógeno e exógeno no trato gastrintestinal, assumindo que os derivados de caseína no lúmen mantinham a relação carbono: nitrogênio original. Os ratos sofreram jejum prévio de 2 dias, receberam a dieta por intubação gástrica e, 4 horas após, apresentaram uma diluição do nitrogênio da dieta de 6 a 7 vezes com o nitrogênio endógeno e as relações molares dos aminoácidos livres dos conteúdos gastrintestinais, foram bem diferentes daquelas da caseína ingerida.

Dawson e Porter (1962) ministraram via oral 8 μ Ci de radioatividade de proteína de alga *Chlorella* marcada com ^{14}C em ratos, encontrando que 30% da atividade desaparecia do trato digestivo em 1 hora e 60% após 3 horas. A máxima atividade dos amino-

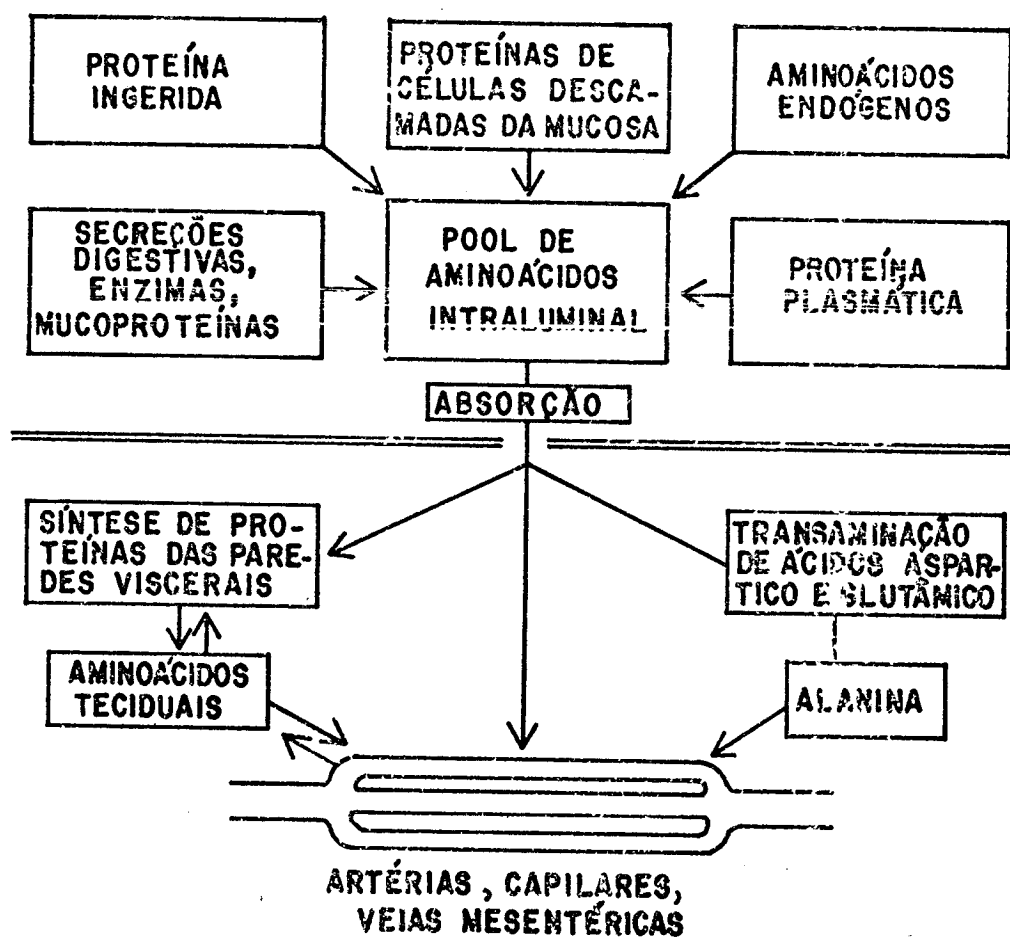


FIGURA 1. "Pool" de aminoácidos no intestino delgado.

Transcrito e traduzido de Nasset (1965).

ácidos do plasma do sangue portal foi atingida entre 30 min e 1 hora e daqueles do sangue sistêmico entre 1 e 2 horas após a ministração da proteína radioativa. Em trabalho na mesma linha, Gallo-Torres e Ludorf (1973) observaram um aumento na capacidade de absorção protéica pelo intestino delgado de ratos em jejum, quando comparada com a de ratos alimentados. Estes autores intubaram 10 μCi de proteína de *Chlorella* ^{14}C via intragástrica e encontraram um máximo de radioatividade no sangue da veia porta entre 45 e 60 minutos após.

Estudos também têm sido direcionados no sentido de se observar o aparecimento de proteínas endógenas, peptídios e aminoácidos no trato gastrintestinal de ratos, após injeção intravenosa com aminoácidos marcados. Neste sentido, Jacobs (1965) observou que, alguns minutos após a injeção de 5 μCi de ácido aspártico ^{14}C , já era possível sua detecção no conteúdo luminal. Ochoa-Solano e Gitler (1968) isolaram proteínas endógenas do estômago e intestino delgado de ratos, 2 horas após a injeção de metionina marcada com enxofre 35 na veia caudal.

Mais recentemente, trabalhos mais complexos em metabolismo proteico têm sido realizados, como a determinação de um modelo matemático da cinética de absorção da arginina ^{14}C , via oral, em cordoniz japonesa (Gazo, 1976).

Embora não se pudesse encontrar literatura referente a feijão, a marcação isotópica vem sendo utilizada para avaliar a qualidade nutricional de proteínas. A digestibilidade da caseína, corrigida pela excreção do nitrogênio metabólico fecal real, em bezerros jovens, foi determinada por Lofgreen e Kleiber (1953). Para tal, os autores marcaram a caseína com fósforo 32 e utilizaram a relação $\text{N} : ^{32}\text{P}$ da caseína e das fezes, para o cálculo da proporção do nitrogênio fecal de origem metabólica, encon-

trando uma digestibilidade média de 93,5%. A digestibilidade de leite em pó tritiado, obtido do leite de uma vaca à qual era fornecida água tritiada para beber (266 $\mu\text{Ci/L}$), foi determinada em bezerros e porcos (Van Bruwaene *et alii*, 1976). Os resultados indicaram que o leite em pó era melhor absorvido pelos bezerros, 98,9% de digestibilidade, do que pelos porcos, em que apresentou 91,8%. A utilização de nitrogênio 15 com vistas ao estudo de metabolismo nitrogenado e qualidade protéica, já foi feita com proteína de alga *Chlorella*, em ratos Wistar (Yamaguchi *et alii*, 1973) e de trigo, em frangos em crescimento e galinhas em postura (Hennig *et alii*, 1976).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Fontes protéicas

3.1.1.1. Feijão integral: utilizou-se feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) em grão, do cultivar (cv.) Carioca 80, das safras da seca de 1982, das águas de 1983 e do inverno de 1984, procedentes da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico, Campinas, São Paulo, contendo um teor protéico médio (Nx6,25) de $21,51 \pm 0,29\%$.

3.1.1.2. Feijão integral marcado isotopicamente com nitrogênio 15 (^{15}N): feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca 80) em grão, contendo 1,460% de ^{15}N , obtido através do cultivo das plantas em canteiro experimental, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. O canteiro experimental media 390x105 cm e era formado de três filas de pares de plantas espaçados 10 cm uns dos outros (Figuras 2 e 3). A marcação foi realizada pela adubação com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, enriquecido de 10 átomos % de ^{15}N . A primeira aplicação, de 84g, foi feita no solo durante a semeadura. Dez dias após a inflorescência e, em intervalos de dois dias, realizou-se 5 aplicações adicionais, num total de 22g, aspergindo-se as folhas com solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1%. Os grãos foram colhidos no estágio seco e apresentaram uma percentagem de proteína bruta (Nx6,25) de 21,25%.

3.1.1.3. Extrato protéico, frações protéicas globulina e albumina obtidos do feijão integral, por extração com NaCl 0,5M.

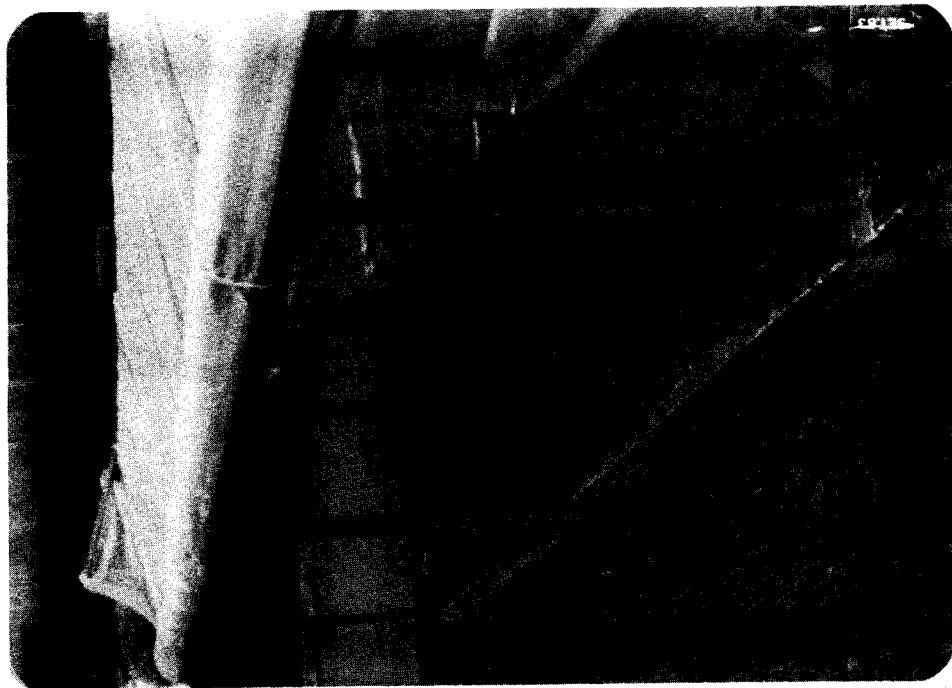


FIGURA 2. Canteiro experimental de cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca 80), marcado com nitrogênio 15 em sua proteína; feijoeiros com cerca de 20 dias após germinação.



FIGURA 3. Canteiro experimental de cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca 80), marcado com nitrogênio 15 em sua proteína; feijoeiros em início de floração, com cerca de 35 dias após germinação.

3.1.1.4. Caseína comercial TACRIGY Ltda, contendo 81,43% de proteína bruta (Nx6,38).

3.1.1.5. Ração comercial Du Coelho, Anhanguera - DURATEX S.A., com teor mínimo de proteína bruta (Nx6,25) de 17,00% (valor fornecido pelo fabricante).

3.1.2. Animais utilizados nos ensaios biológicos

Utilizados ratos albinos fêmeos, da linhagem Wistar, provenientes do biotério da Escola Paulista de Medicina, São Paulo. Os ratos recém-desmamados (21-25 dias), pesando aproximadamente entre 30 a 40g, eram colocados em gaiolas de crescimento individuais, com ração comercial e água, à vontade, em biotério com temperatura ambiente controlada de $23 \pm 2^{\circ}$, durante um período de aclimatação de 10 a 14 dias. Por ocasião dos ensaios, os ratos apresentavam um peso de cerca de 65 a 75g.

3.1.3. Aminoácido radioativo

3.1.3.1. Glicina uniformemente marcada com carbono 14, 114 mCi/mmol, proveniente de The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England.

3.1.3.2. Glicina uniformemente marcada com carbono 14, 116 mCi/mmol, proveniente de New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinações químicas e bioquímicas

3.2.1.1. Nitrogênio: determinado por método micro-Kjeldahl, modificado por Gunning, em 1889, e por Arnold e Wedemeyer, em 1892, *apud* Montes (1966), utilizando-se também dióxido de titânio como catalisador (Williams, 1973).

3.2.1.2. Proteína: determinada, em termos de "proteína bruta", pelo produto entre a percentagem de nitrogênio e o fator de conversão de nitrogênio para proteína, 6,25 no caso de feijão e 6,33 para a caseína; eventualmente, era também determinada pelos métodos do biureto (Weichselbaum, 1946) e o de Lowry *et alii*, 1951.

3.2.1.3. Nitrogênio 15: determinado a partir dos titulados obtidos nas determinações de nitrogênio, adotando-se os procedimentos recomendados por Bremner (1965) e pela International Atomic Energy Agency (1972), utilizando-se um espectrômetro de massa Varian Matt-230.

3.2.1.4. Carbono total e radioatividade do carbono 14 (^{14}C): determinados pelo método da combustão ou via seca, utilizando-se aparelho Beckman Biological Oxidizer, sendo o CO_2 recolhido em solução de hidróxido de sódio que era parte titulada e, outra parte misturada à solução cintiladora, de acordo com o procedimento de Schöniger, s.d., *apud* Bruwaene *et alii* (1976), sendo a contagem devida ao ^{14}C , efetuada em cintilador líquido Nuclear Enterprises LSC-2.

3.2.1.5. Fibra bruta: mais particularmente celulose, determinada no feijão integral, basicamente segundo o método de Kamer e Ginkel (1952).

3.2.1.6. Atividade de inibidor de tripsina: utilizada tripsina de pâncreas bovino (Sigma, 12000 BAEE) e a determinação era feita no feijão integral e nas proteínas isoladas segundo Kunitz (1947), com modificações introduzidas por Kakade *et alii* (1969), mais particularmente, o uso de uma solução de caseína 2%, o volume de reação e a forma de expressar a atividade. Com relação a esta última, uma unidade de tripsina inibida (UTI) era correspondente a um decréscimo de 0,01 da absorbância a 280 nm, obtida no extrato, após a hidrólise de caseína pela tripsina, na presença de inibidor.

3.2.1.7. Atividade hemaglutinante: determinada no feijão integral e nas proteínas isoladas, por método de diluição seqüencial (Kabat e Mayer, 1971), utilizando-se hemácias tripsinizadas (Jaffé e Brücher, 1972) de suíno e o procedimento de Junqueira e Sgarbieri (1981), sendo a interpretação dos resultados feitos de acordo com Oliveira e Silva (1970).

3.2.1.8. Digestibilidade *in vitro*: determinada nas fontes protéicas, mediante a digestão da amostra pela pepsina (Sigma, 1:10000) mais pancreatina (Merck, 350 FIP-U/g protease; 7500/g lipase; 7500/g amilase) utilizada por Akesson e Stahmann (1964), modificada por Galeazzi (1981), e o cálculo descrito por Waterman e Johns (1921) com a correção do nitrogênio solúvel da amostra.

3.2.1.9. Determinação dos aminoácidos: feita no feijão integral e caseína, utilizando o método de resina de troca iônica de Spackman

et alii (1958), em analisador automático Beckman modelo 119 CL, procedendo-se segundo as recomendações da Beckman Instruments (1977).

3.2.2. Obtenção das proteínas isoladas do feijão

O feijão em grão era moído até uma farinha de granulometria 70 mesh e as proteínas extraídas a partir desta farinha, em solução de NaCl 0,5M, segundo Whitaker e Sgarbieri (1981). A farinha mais 1% (p/p) de polivinilpolipirrolidona (Sigma) eram misturadas à solução salina na proporção de 1:6 (p/v). A mistura foi inicialmente submetida à vibração ultrasônica (vibrador ultrasônico Bronwill, modelo Biosonik IV) por 4 minutos e, após, à agitação magnética por 2 horas, com pH ajustado a 7,0 (Sawazaki *et alii*, 1983). A suspensão formada era centrifugada a 16300 x g, 20 min., 4°C (centrífuga Sorvall, modelo RC2-B) e o sobrenadante dialisado, também a pH 7,0, para eliminar o NaCl e compostos de baixo peso molecular (PM<8000). O extrato dialisado foi congelado e liofilizado (liofilizador Virtis, modelo 10-146 MR-BA), consistindo no "extrato protéico do feijão". No caso de se fazer nova centrifugação do extrato dialisado a 16300 x g, 30 min, 4°C, separavam-se duas frações quanto à solubilidade: uma insolúvel em água, denominada "fração globulina", e outra solúvel em água, denominada "fração albumina" que, por sua vez, eram congeladas e liofilizadas. Sawazaki *et alii* (1983) verificaram que, nestas condições, a fração globulina obtida era aparentemente livre de albuminas, mas a fração albumina possuía contaminação por globulinas parcialmente solúveis em água. O extrato protéico obtido possuía 70,40% de proteína bruta, correspondendo a 76,34% daquela existente no feijão integral e as frações globulina e albumina, teores de 79,54% e 48,63% de proteína bruta, respectivamente, estando numa relação de 2,4:1 no extrato protéico.

3.2.3. Ensaio de modificações químicas das proteínas

As frações protéicas extraídas do feijão, globulina e albumina, e a caseína (Sigma), foram submetidas a processos de metilação redutiva e de dansilação, como possíveis técnicas de marcação destas proteínas. A metilação redutiva, mediante a utilização de formaldeído radioativo, seria utilizada para avaliar o metabolismo protéico e a dansilação, devido à formação de produto fluorescente (Gray e Hartley, 1963), para observar possível ligação com a mucosa intestinal dos ratos. A metilação redutiva dos grupos amino livres das proteínas foi realizada segundo o método de Means e Feeney (1968). Para se determinar a percentagem de modificação obtida, procedeu-se a determinação dos grupos amino livres, antes e depois da metilação, através da reação com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico, TNBS, (Sigma), proposta por Fields (1972). A reação das proteínas com o cloreto de dansilo, cloreto de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo (Ruka), foi feita conforme ao método de Gray e Hartley (1963). Uma lectina pura, a concanavalina A (Sigma), foi também dansilada. A fluorescência obtida foi determinada a partir da dissolução das proteínas dansiladas em solução de uréia 8M, utilizando-se um fluorômetro Coleman 12C, com filtro primário de 330nm e secundário de 560nm, fluoresceína de sódio como padrão comparativo e branco de caseína. Verificou-se a influência destas modificações químicas na digestibilidade pela pepsina e pancreatina e nas atividades antitriptica e hemaglutinante das frações protéicas do feijão, utilizando-se a caseína como controle.

3.2.4. Ensaio biológicos

3.2.4.1. Ensaio de intubação gástrica com proteínas do feijão e lectina de feijão-de-porco (*C. ensiformis*) dansiladas

As proteínas dansiladas, frações globulina e albumina, caseína e concanavalina A, foram intubadas em ratos previamente submetidos a jejum de 24 horas, com água a vontade, para esvaziamento do trato gastrintestinal (Sgarbieri *et alii*, 1982a) e à anestesia leve com éter etílico (Smith, 1972; King *et alii*, 1980a). Intubou-se 50mg de cada proteína e 20mg da lectina, sob forma de 2 mL de suspensão em NaCl 0,9%, utilizando-se 2 ratos em cada caso. Decorridos 1 hora e meia após a intubação, os ratos foram sacrificados por asfixia com éter etílico e dissecados. Na dissecação, os duodenos e porções do jejuno médio eram removidos e colocados em fixador formaldeído, para inclusão em parafina e cortes histológicos (8 μ m), que foram corados com hematoxilina e caseína (HE).

3.2.4.2. Preparo das dietas

Todas as dietas utilizadas eram preparadas basicamente segundo a Association of Official Analytical Chemists (1975) para conter 10% de proteína e 8% de óleo. O teor percentual real de proteína bruta médio obtido foi de $10,53 \pm 0,36\%$ e utilizou-se 8% de óleo de milho (Mazola). A mistura salina foi preparada segundo Hegsted *et alii* (1941) e utilizada para fornecer 4% da dieta (Nutritional Biochemicals Corporation, 1977/1978). A mistura vitamínica para dieta fortificada, foi preparada e utilizada em nível de 2% da dieta, de acordo com a Nutritional Biochemicals Corporation (1977/1978). A adição de fibras (celulose) foi omitida no caso das dietas de feijão, visto que o mesmo já continha 5,20% de fibra bruta

ta, mais particularmente celulose, o que fazia com que o teor de fibra bruta das dietas ficasse em torno de 2,5%. Igual teor era, por vezes, adicionado à dieta de caseína, para fins comparativos. As dietas eram completadas à 100% com a fração carboidrato, sendo 25% desta fornecido como sacarose (açúcar refinado União) e 75% como amido (amido de milho Maizena), segundo Sgarbieri (1979). O feijão em grão e o extrato protéico do feijão foram utilizados como fontes protéicas, tanto em estado cru como tratados termicamente. Para incorporação às dietas, os grãos, adrede macerados em água (1:3, p/v) por 12 horas, eram submetidos a cozimento em panela de pressão, na mesma proporção, de conformidade com o procedimento doméstico, congelados, liofilizados e moídos até granulometria de 20 mesh. Parte do extrato protéico do feijão era autoclavado a 121°C por 30 min. (Antunes e Sgarbieri, 1980; Marquez e Lajolo, 1981), congelado, liofilizado e também moído até 20 mesh. Os grãos e o extrato protéico incorporados em estado cru eram somente moídos até a mesma granulometria. No preparo da dieta aprotéica, não foi adicionada fibra e a proteína foi substituída pela fração carboidrato utilizada nas outras dietas. As formulações das dietas, da mistura salina e da mistura vitamínica, estão dispostas nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

3.2.4.3. Determinação da digestibilidade e do valor biológico

Determinados através de balanço de nitrogênio, em que os ratos eram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com dieta e água *ad libitum*. Os nitrogênios ingeridos com a dieta, fecal e urinário eram determinados e verificadas as variações de peso dos animais. A digestibilidade aparente e verdadeira foi calculada conforme descrito por Wolzak *et alii* (1981) e Liener e Thompson (1980),

TABELA 1. Formulação das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.

COMPONENTE	PERCENTAGENS (dietas) ¹					
<u>Fonte protéica</u>						
Caseína comercial	10,00	10,00	-	-	-	-
Feijão integral cozido	-	-	10,00	-	-	-
Feijão integral cru	-	-	-	10,00	-	-
Extrato protéico autoclavado	-	-	-	-	10,00	-
Extrato protéico cru	-	-	-	-	-	10,00
<u>Aprotéica</u>						
Óleo vegetal (milho)	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Mistura salina ²	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Mistura vitamínica ³	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fibra (celulose)	-	2,50	-	-	-	-
Carboidrato ⁴ q.s.p.	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

1. Cada coluna representa uma dieta, com a respectiva fonte protéica.

2. Segundo Hegsted *et alii* (1941), disposta na Tabela 2.

3. Segundo Nutritional Biochemicals Corporation (1977/1978), disposta na Tabela 3.

4. Fornecido 1/3 como açúcar refinado comercial e 2/3 como amido de milho comercial.

TABELA 2. Formulação da mistura salina utilizada nos ensaios biológicos, segundo Hegsted *et alii* (1941).

COMPONENTE	FÓRMULA	PERCENTAGEM
Carbonato de cálcio	CaCO_3	29,974
Fosfato di-potássico	K_2HPO_4	32,222
Fosfato mono-cálcico	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,493
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,191
Cloreto de sódio	NaCl	16,735
Citrato férrico	$\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (<i>sic</i>)	2,747
Iodeto de potássio	KI	0,079
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,499
Cloreto de zinco	ZnCl_2	0,024
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,029

TABELA 3. Formulação da mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos, segundo Nutritional Biochemicals Corporation (1977/1978).

COMPONENTE	PERCENTAGEM
Concentrado de Vitamina A (200000 UI/g)	2,948
Concentrado de Vitamina D (400000 UI/g)	0,163
Alfa-tocoferol	3,276
Ácido ascórbico	29,486
Inositol	3,276
Cloreto de colina	49,144
Menadiona	1,474
Ácido p-aminobenzóico	3,276
Niacina	2,948
Riboflavina	0,655
Hidrocloreto de piridoxina	0,655
Hidrocloreto de tiamina	0,655
Pantotenato de cálcio	1,965
Biotina	0,013
Ácido fólico	0,058
Vitamina B-12	0,001

respectivamente, e o valor biológico aparente e verdadeiro segundo Mitchell (1923-24). Foram realizados 3 ensaios de balanço de nitrogênio, com características diferentes, dadas a seguir:

3.2.4.3.1. Ensaio A: para este balanço foram utilizados ratos de peso médio $65,2 \pm 5,7$ g, que foram colocados em dietas de caseína, feijão (safra da seca de 1982) cru, feijão cozido, com teor proteico (Nx6,25) médio de $10,35 \pm 0,22\%$, e aprotéica, durante 11 dias, sendo 5 de adaptação e a coleta das fezes realizadas nos 6 dias restantes. Utilizou-se 6 ratos em cada dieta. O balanço visou efetuar a determinação das digestibilidades aparentes e verdadeiras das proteínas das dietas. Paralelamente, foram colocados 6 ratos em dieta comercial, em gaiolas de crescimento. Todos os animais utilizados foram pesados no início do experimento, aos 5 dias de adaptação e aos 11 dias. Passado este período, os ratos em caseína foram mantidos como controle e, os ratos até então em feijão cru, foram postos na dieta comercial, para observar sua recuperação em termos de peso. Por outro lado, aqueles ratos que vinham sendo mantidos nesta dieta, eram, por sua vez, colocados na dieta de feijão cru, com vistas a se observar o número de dias em que permaneciam vivos. Após a morte de 50% dos ratos, os sobreviventes, bem como 2 ratos em dieta de caseína e 2 ratos recuperados na dieta comercial, foram sacrificados mediante asfixia com éter etílico e dissecados, removendo-se o duodeno e parte do jejuno médio. Ato contínuo, visando observar o efeito da dieta de feijão cru na mucosa intestinal, realizou-se os cortes histológicos, que foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina e, eventualmente, à reação do ácido periódico-Schiff (PAS).

3.2.4.3.2. Ensaio B: neste balanço, os ratos eram colocados em jejum por 24 horas (Sgarbieri *et alii*, 1982a) com água à vontade para esvaziamento do trato gastrintestinal, submetidos à anestesia leve com éter etílico (Smith, 1972; King *et alii*, 1980a) e à injeção intraperitoneal de uma dose única de 10 microcuries (Comar, 1955) de glicina ^{14}C , uniformemente marcada (U), proveniente de New England Nuclear. Os ratos jejunos apresentaram um peso médio de $60,5 \pm 5,0\text{g}$ e, cerca de 2 horas após a injeção (Ochoa-Solano e Gitler, 1968), foram colocados em dieta de caseína, caseína mais 2,5% de fibra, feijão (safra do inverno de 1984) cozido, feijão cru, contendo uma percentagem média de proteína bruta de $10,79 \pm 0,35\%$, e aprotéica. Utilizou-se 3 ou 4 ratos por dieta e procedeu-se a um balanço de nitrogênio de 4 dias. Além do nitrogênio, determinou-se também o carbono das fezes e urinas. Visava-se, com este balanço, observar o aparecimento de radioatividade nas fezes e urinas e, através destas medidas, fazer comparações da excreção de nitrogênio endógeno entre as diversas dietas. Realizou-se outro balanço, em condições similares, injetando-se 5 μCi de glicina ^{14}C (U) proveniente de Amersham com 5 ratos de peso médio $79,8 \pm 4,9\text{g}$, sendo 3 colocados em dieta de caseína (1 rato controle, sem aplicação de Gly ^{14}C), 1 em dieta de feijão (safra das águas de 1983) cozido e 1 em dieta de feijão cru, mas procedendo-se às coletas das fezes a cada 24 horas, com vistas a observar a liberação gradativa da radioatividade.

3.2.4.3.3. Ensaio C: à semelhança do balanço anterior, foram utilizados ratos jejunos, de peso médio $57,6 \pm 3,5\text{g}$, mas que foram colocados em dieta de caseína, caseína mais 2,5% de fibra, feijão cozido, feijão cru, extrato protéico de feijão autoclavado e extrato protéico de feijão cru, contendo um teor percentual médio de pro-

teína bruta de $10,46 \pm 0,37\%$. As dietas de feijão foram preparadas a partir do feijão marcado contendo $1,460$ átomos % de ^{15}N . Utilizou-se também 3 ou 4 ratos por dieta e um balanço de nitrogênio de 4 dias. As fezes eram coletadas diariamente. Este balanço destinava-se a quantificar o nitrogênio endógeno fecal e urinário dos ratos nas dietas de feijão, através das determinações das respectivas diluições isotópicas (Gest *et alii*, 1947; Comar *et alii*, 1953). Os ratos nas dietas de caseína, além de servirem como controle, destinavam-se à determinação da percentagem de ^{15}N natural, tomando-se a média das percentagens das dietas, fezes e urinas, para então determinar-se os respectivos excessos de ^{15}N . Ao final do balanço, os ratos foram sacrificados por asfixia com éter etílico, sendo 2 ratos de cada dieta de feijão marcado com ^{15}N congelados para posterior dissecação. Por ocasião desta, os ratos foram descongelados, separando-se e pesando-se as carcaças, as vísceras do tórax e abdome e os conteúdos gastrintestinais, que foram novamente congelados, liofilizados e moídos para homogeneização. Ato contínuo, procedeu-se as determinações de nitrogênio e ^{15}N destes materiais liofilizados, objetivando verificar a incorporação e o percentual de nitrogênio proveniente do feijão nos mesmos, para as diversas dietas.

3.2.5. Tratamento estatístico

As médias dos valores experimentais eram comparadas através da análise de variância, teste F, e, caso apresentassem diferenças significativas, por intermédio do teste de Duncan, 1955, *apud* Puri e Mullen (1980). Com vistas à determinação das relações entre os valores experimentais, adotou-se o critério de se traçar diagramas de dispersão e as curvas de regressão calculadas pelo mé

todo dos mínimos quadrados, sendo as relações testadas de acordo com os coeficientes de correlação linear de Pearson, r , (Snedecor, 1948). A força e o sentido das correlações eram classificadas segundo Levin (1978).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Digestibilidade pela pepsina e pancreatina *in vitro*, atividade de inibidor de tripsina e atividade hemaglutinante das proteínas do feijão.

Os valores encontrados nestas determinações, para as proteínas em natureza e tratadas termicamente, estão dispostos na Tabela 4. Os resultados mostraram que as digestibilidades foram baixas, quando comparadas com a da caseína, tanto para o feijão integral, que ficou na faixa de 17 a 40% de digestibilidade *in vitro*, determinada por Marquez e Lajolo (1981) para 15 variedades brasileiras de *Phaseolus vulgaris*, como para as proteínas isoladas, apresentando valores semelhantes aos encontrados para a variedade Rosinha G2 (Sgarbieri e Whitaker, 1982). O fato das proteínas isoladas terem apresentado valores de digestibilidade superiores àquela do feijão integral, está indicando a existência neste de substâncias, provavelmente de natureza não-protéica, capazes de interagirem com as proteínas do feijão e/ou com as enzimas proteolíticas, reduzindo a digestibilidade. O tratamento térmico ocasionou um aumento dos valores da digestibilidade *in vitro*, cerca de 23-25%, como já demonstrado há tempo por Waterman e Johns (1921) e, mais recentemente, por Liener e Thompson (1980). Com relação aos fatores antinutricionais, verificou-se que ambas as atividades antitriptíca e hemaglutinante, concentram-se principalmente na fração albuminica. Este resultado está de acordo com o relatado por Antunes e Sgarbieri (1980) para o feijão Rosinha G2. O aspecto de que o extrato protéico tenha apresentado uma atividade antitriptíca menor do que o feijão integral, fica em parte explicado pelos resultados

TABELA 4. Digestibilidade *in vitro*, atividade de inibidor de tripsina e de hemaglutinina, de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, em natureza e tratadas termicamente, e digestibilidade *in vitro* da caseína.

PROTEÍNA	DIGESTIBILIDADE <i>in vitro</i> (%)	ATIVIDADE DE INIBIDOR DE TRIPSINA (UTI/mg) ¹	ATIVIDADE DE HEMAGLUTININA (AH/mg) ²
Feijão integral cru	27,2	113,2	239,9
Feijão integral cozido	49,9	nd ³	nd
Extrato protéico em natureza	42,8	93,0	366,2
Extrato protéico autoclavado	67,3	8,2	nd
Fração globulina em natureza	57,4	62,2	158,4
Fração albumina em natureza	46,8	296,1	2064,6
Caseína	91,6	-	-

1. Unidades de tripsina inibidas por miligrama de proteína,
2. Atividade de hemaglutinina por miligrama de proteína, consistindo da recíproca da menor quantidade em mg de proteína da amostra, capaz de causar aglutinação de eritrócitos tripsi-nizados de suíno, nas condições do teste.
3. Não detectada.

encontrados por Antunes (1979), que verificou a presença de inibidores de proteases em sólidos dialisáveis (PM<10000) obtidos de *Phaseolus vulgaris*. Sawazaki *et alii* (1983) encontraram atividade antitriptica, embora fraca, em sobrenadantes, após precipitação de proteína hidrolisada de feijão Carioca 80 com ácido tricloroacético (PM<2000).

4.2. Efeito das modificações químicas na digestibilidade *in vitro* e fatores antinutricionais das frações protéicas do feijão

As percentagens de metilação redutiva obtidas para as frações globulina e albumina e para a caseína, apresentaram o valor médio de $54,38 \pm 0,66\%$, e a dansilação, a média de $20,4 \pm 5,6$ unidades arbitrárias de fluorescência, comparadas com 80 unidades fixadas para uma solução contendo 5 µg/mL de fluoresceína de sódio. A influência destas modificações nas digestibilidades pela pepsina e pancreatina *in vitro*, assim como nas atividades antitriptica e hemaglutinante, está apresentada na Tabela 5. Verifica-se que a metilação redutiva ocasionou uma redução da digestibilidade da caseína de 19%, conforme ao já relatado por Galenbeck *et alii* (1977) e de magnitude semelhante àquelas encontradas por Lee *et alii* (1978), utilizando alfa-quimotripsina e tripsina. Para as frações protéicas metiladas do feijão, as reduções da digestibilidade foram bem maiores e as atividades de inibidor de tripsina ficaram bastante diminuídas, provavelmente devido ao fato de que os inibidores funcionam como um falso substrato para a tripsina (Sgarbieri e Whitaker, 1981), que passa a não reconhecer nestes, os resíduos de lisina que foram metilados. As atividades hemaglutinantes ficaram ainda mais diminuídas, ocorrendo inativação total no caso da

TABELA 5. Efeito da metilação redutiva e da dansilação das frações protéicas, globulina e albumina, de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, e da caseína, sobre a digestibilidade pela pepsina mais pancreatina *in vitro*, atividade antitriptica e hemaglutinante.

PROTEÍNA/PROPRIEDADE	EM NATUREZA	MODIFICADAS QUIMICAMENTE	
		METILAÇÃO	DANSILAÇÃO
<u>Caseína</u>			
digestibilidade (%)	91,6	74,3 (-19) ³	86,0 (-6)
<u>Fração globulina</u>			
digestibilidade (%)	57,4	30,9 (-46)	60,0 (+5)
ativ. antitriptica (UTI/mg) ¹	62,2	16,0 (-74)	54,2 (-13)
ativ. hemaglutinante (AH/mg) ²	158,4	nd ⁴	44,9 (-72)
<u>Fração albumina</u>			
digestibilidade (%)	46,4	12,1 (-74)	49,3 (+6)
ativ. antitriptica (UTI/mg)	296,1	103,3 (-65)	378,1 (+28)
ativ. hemaglutinante (AH/mg)	2065,6	135,4 (-93)	341,4 (-84)

1. Unidades de tripsina inibidas por miligrama de proteína;
2. Atividade hemaglutinante por miligrama de proteína, consistindo da recíproca da menor quantidade de mg de proteína de amostra, que causa aglutinação de eritrócitos tripsinizados de suíno, nas condições do teste;
3. Os números dentro dos parênteses correspondem a percentagem de perda (-) ou ganho (+) com a modificação química;
4. Não detectada.

fração globulina. A dansilação, por sua vez, não modificou de forma marcante as digestibilidades e as atividades antitripticas, mas reduziu notavelmente as atividades hemaglutinantes. Com base nestes resultados, verificou-se das dificuldades de interpretação dos resultados, caso fossem utilizadas estas técnicas de marcação, para estudo do metabolismo protéico do feijão e possíveis ligações com a mucosa intestinal de ratos.

4.3. Cortes histológicos do intestino delgado de ratos submetidos à intubação gástrica com proteínas do feijão e lectina dansiladas

Um desenho esquemático da mucosa intestinal, com suas características morfológicas normais, está mostrado na Figura 4. Os cortes histológicos dos duodenos e jejunos dos ratos intubados com as frações globulina e albumina, bem como com a caseína dansilada, não mostraram fluorescência ligada às vilosidades, nem qualquer alteração das mesmas. Tal fato ratifica os resultados encontrados na sub-seção anterior, sabendo-se que as lectinas existentes no feijão e responsáveis pela atividade hemaglutinante (Jaffé, 1969), ligam-se à superfície luminal das vilosidades intestinais dos ratos (King *et alii*, 1980b), ocasionando dilaceração das microvilosidades do duodeno, quando administradas via intragástrica (King *et alii*, 1980a). Assim, a grande redução observada na atividade hemaglutinante devida à dansilação, provavelmente inibiu estes efeitos. Entretanto, os cortes dos duodenos dos ratos intubados com concanavalina A, apesar de não mostrarem fluorescência, apresentaram uma intensa descamação de células absortivas na região apical das vilosidades e uma redução do número de células caliciformes, em

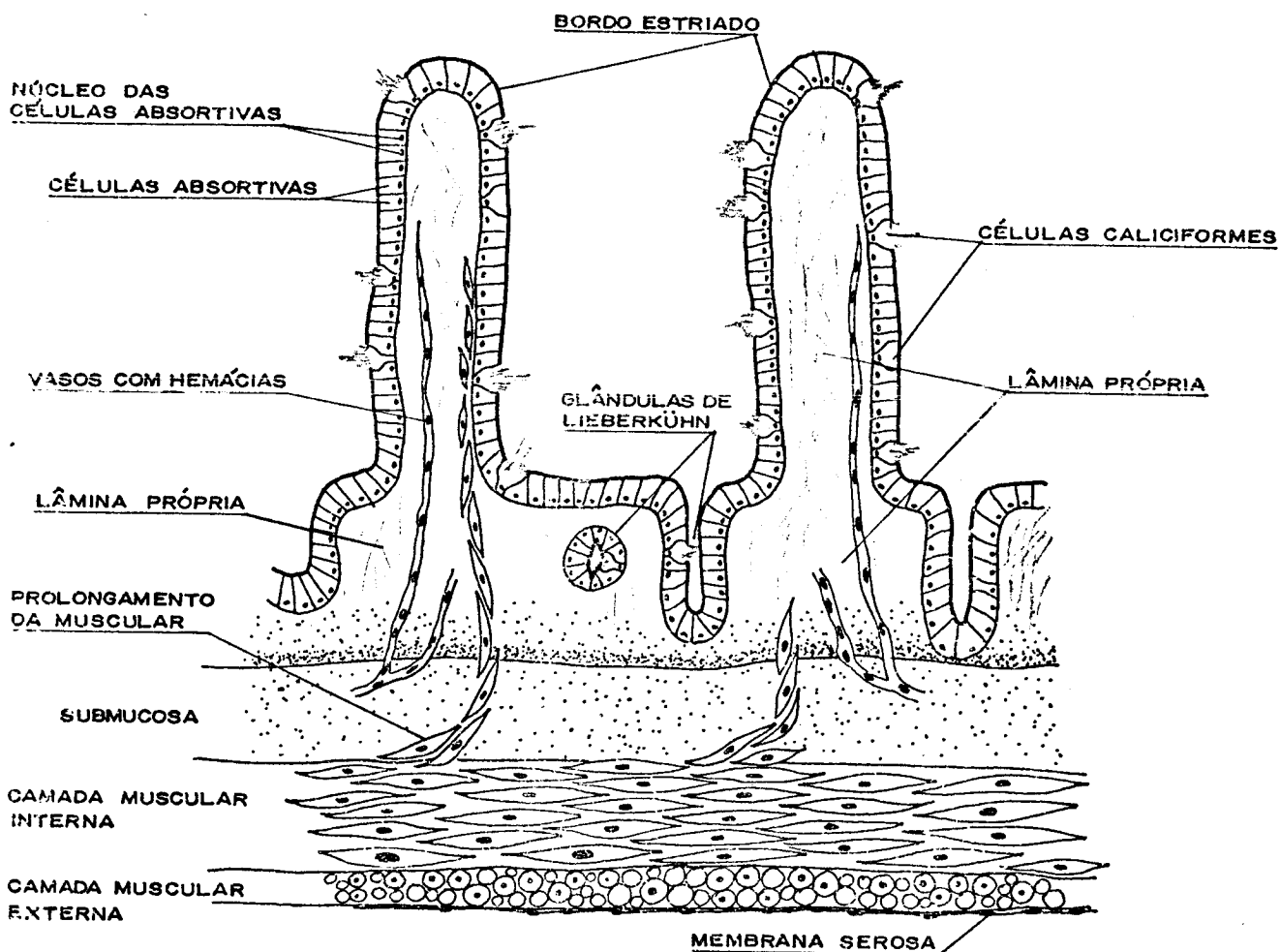


FIGURA 4. Desenho esquemático de mucosa de intestino delgado, mostrando as vilosidades e alguns componentes de maior interesse, para estudo dos efeitos de lectinas de feijão no duodeno e jejuno de ratos.

sua metade superior. Estes aspectos estão mostrados nas Figuras 5, 6 e 7. A elevada toxidez do extrato salino bruto de *Canavalia ensiformis*, via intraperitoneal, em ratos, já foi demonstrada por Muelenaere (1965), sendo comparável e mesmo superior às daquelas variedades de *Phaseolus vulgaris*. A seta na Figura 7 está indicando o final da continuidade da bordadura em escova da vilosidade, onde inicia o efeito da ação da lectina. Deve ser ressaltado o fato de que, apesar da ação tóxica verificada, a concanavalina A apresentou uma atividade hemaglutinante muito baixa, mesmo em forma nativa, de 2,0 AH/mg, o que está de acordo com o demonstrado por Muelenaere *op. cit.* e descrito por Liener (1974), que nem sempre a ação tóxica de uma lectina pode ser medida pela sua atividade hemaglutinante.

4.4. Composição de aminoácidos do feijão Carioca 80 e da caseína comercial

Os resultados dos aminogramas apresentados na Tabela 6, mostram que tanto a composição de aminoácidos do cultivar Carioca 80, como a da caseína comercial, foram semelhantes às aquelas reportadas por Sgarbieri *et alii* (1979) para outros cultivares de feijão e Montes (1966) para a caseína. A única deficiência em aminoácidos essenciais, com relação a uma proteína padrão (NRC, 1980), foi a de sulfurados totais (1/2 Cys + Met) no feijão Carioca 80, como já amplamente divulgado na literatura para *Phaseolus Vulgaris* (Tobin e Carpenter, 1978; Sgarbieri e Whitaker, 1982). O conteúdo de triptofano, apesar de não ter sido determinado, sabe-se não apresentar problemas de limitação em feijão (Tobin e Carpenter, 1978) e caseína (Montes, 1966) com relação ao valor de 1,1 g/16gN, sugerido por NRC (1980).

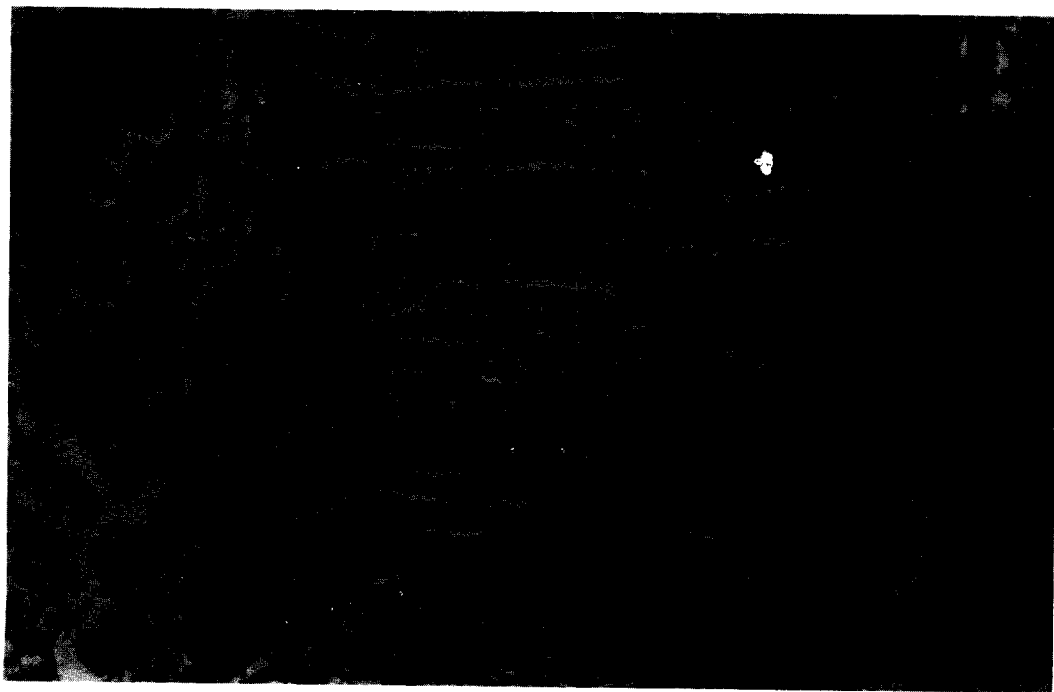


FIGURA 5. Corte histológico do duodeno de rato, 1 hora e meia após intubação gástrica com canavalina A; vl - vilosidades; cc - células caliciformes. HE, 111X.



FIGURA 6. Corte histológico do duodeno de rato, 1 hora e meia após intubação gástrica com canavalina A (detalhe ampliado da Fig. 5); cc - células caliciformes. HE, 220X.



FIGURA 7. Corte histológico do duodeno de rato, 1 hora e meia após intubação gástrica com concanavalina A (detalhe ampliado da Fig. 6). HE, 550X.

TABELA 6. Composição de aminoácidos (g/16g N) da proteína do feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*), da caseína comercial, e do padrão de referência para proteína de alta qualidade, segundo National Research Council (1980).

AMINOÁCIDO	FEIJÃO CARIOCA 80	CASEÍNA	PROTEÍNA PADRÃO (NRC, 1980)
Ácido aspártico	14,2	8,4	
Treonina	5,9	5,5	3,5
Serina	6,3	7,1	
Ácido glutâmico	18,4	29,6	
Prolina	3,9	9,3	
Glicina	5,3	2,2	
Alanina	5,4	3,4	
Valina	9,6	7,1	4,8
1/2 Cistina	0,3	traços	
Metionina	1,0	2,9	
Sulfurados totais (1/2 Cys + Met)	1,3	2,9	2,6
Isoleucina	5,7	5,2	4,2
Leucina	9,6	9,9	7,0
Tirosina	2,5	5,5	
Fenilalanina	6,6	5,7	
Aromáticos totais (Tyr + Phe)	9,1	11,2	7,3
Histidina	3,9	3,1	1,7
Lisina	8,1	7,9	5,1
Arginina	6,8	4,2	

4.5. Resultados obtidos no Ensaio A

Os valores médios das digestibilidades aparentes e verdadeiras, encontrados para o feijão e a caseína, e a variação de peso média dos ratos, encontram-se na Tabela 7. A digestibilidade do feijão cozido ficou na faixa de médias relatadas por Tobin e Carpenter (1978) e a do feijão cru foi baixa e similar àquela encontrada por Pusztai *et alii* (1979a), de 31% para o cultivar Pinto III. Verificou-se um aumento absoluto de cerca de 40% na digestibilidade do feijão devido ao tratamento térmico, que está de acordo com o encontrado por Kakade e Evans (1966) para a variedade Sanilac. A caseína mostrou uma digestibilidade superior a 90%, como já amplamente divulgada na literatura (Pusztai *et alii*, 1975; Wolzak *et alii*, 1981).

A Figura 8 mostra a variação do peso médio dos ratos, nas diversas dietas utilizadas no balanço e na dieta comercial, onde pode ser observado que o ganho de peso por rato, nesta última, foi semelhante àquele por rato em dieta de caseína, decorridos 11 dias correspondentes ao período de adaptação e balanço propriamente dito. Após este período, os ratos que até então eram mantidos na dieta de feijão cru e foram colocados na dieta comercial, mostraram uma recuperação do peso, aos 33 dias do experimento, com relação aos ratos em caseína. Este fato demonstrou ser o efeito tóxico do feijão cru reversível, como já há muito demonstrado por Osborne e Mendel, em 1919, *apud* Johns e Finks (1920) e, mais recentemente, por Pusztai *et alii* (1979b). Por outro lado, dos ratos que foram colocados na dieta de feijão cru, após 23 dias, metade continuavam vivos. Assim, o cultivar Carioca 80 apresentou uma toxidez baixa, quando comparada com aquelas encontradas na literatura para outros cultivares de *Phaseolus vulgaris* (Honavar *et alii*, 1962; Antunes e

TABELA 7. Variação de peso, digestibilidade aparente e verdadeira, em ratos¹ Wistar, colocados em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, safra da seca de 1982, ca-seína e aptótica, em balanço de nitrogênio de 6 dias.

DIETA	VARIÇÃO PESO (g)	N ingerido (mg)	N fecal (mg)	DIGESTIBILIDADE (%)	
				APARENTE	VERDADEIRA
Caseína	17,1±5,3	1061,1±122,7	101,0± 5,7	90,49±0,49	93,28±0,61
Feijão cozido	5,9±4,0	870,0±106,6	274,0±40,0	68,56±1,43	72,00±1,65
Feijão cru	-5,9±1,2	575,2± 29,6	418,2± 5,5	27,17±4,75	32,53±4,48
Aptótica	-5,0±2,2	21,8± 2,1	29,6± 3,0	-	-

1. Os valores representam a média para 6 ratos.

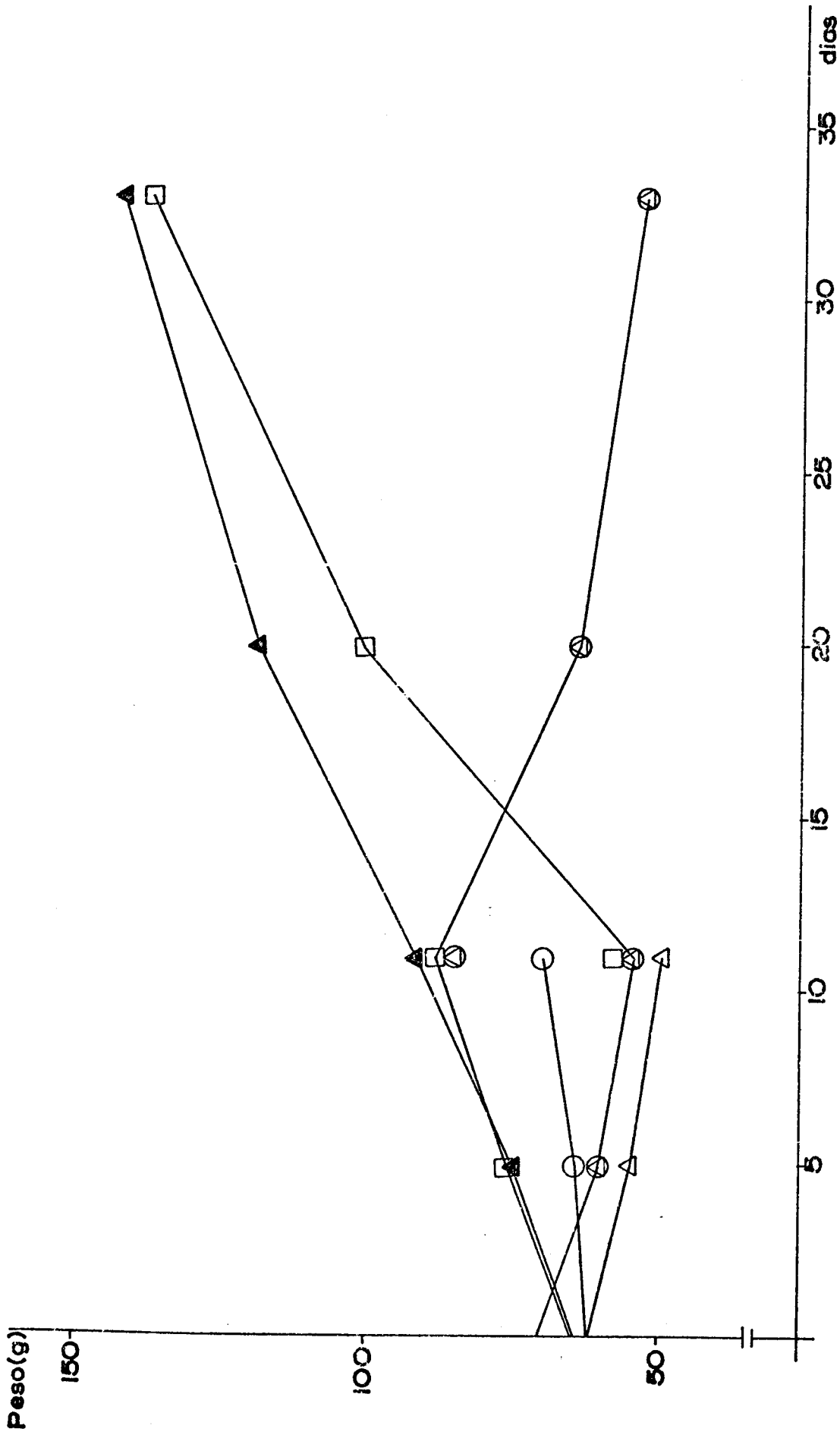


FIGURA 8. Variação do peso médio de ratos Wistar em dietas de feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*), safra da seca de 1982, cozido (○), caseína (▲), aptótica (△), e em dietas de feijão cru (⊗) e comercial (□), alternadamente, ao longo do tempo.

Sgarbieri, 1980; Bender e Reaidi, 1982). Outro aspecto que corrobora este fato, é o de que, durante os seis dias de balanço, a perda de peso média dos ratos em feijão cru, era aproximadamente igual àquela dos ratos em dieta aprotéica (Tabela 7), enquanto que para outros cultivares é normalmente maior (Pusztai *et alii*, 1977). Com base nestes resultados, confirmou-se a viabilidade da realização de balanços de nitrogênio com dietas contendo feijão cultivar Carioca 80 em estado cru, como única fonte protéica.

Um corte histológico do duodeno de rato, corado com hematoxilina e eosina, após 34 dias em dieta de caseína, está mostrada na Figura 9, onde podem ser observadas vilosidades seccionadas em diferentes níveis. São vistas com nitidez e guardando todas as relações morfológicas normais, as seguintes estruturas: células absorptivas, exibindo o seu bordo estriado (microvilosidades) em perfeita continuidade; células caliciformes; lâmina própria; glândulas de Lieberkühn; submucosa e camada muscular. A Figura 10 mostra um detalhe da Figura 9, apresentando as mesmas estruturas em maior aumento, com exceção da submucosa e camada muscular, que aparecem juntamente com as glândulas de Lieberkühn, em outro detalhe, na Figura 11. A Figura 12 mostra um corte histológico, também de duodeno de rato em caseína, após reação do PAS. As glicoproteínas coram-se em vermelho (em negro na imagem branco e preto), fazendo com que as superfícies celulares correspondente às microvilosidades e o conteúdo das células caliciformes, secretoras de muco, apareçam mais intensamente (Kenny e Booth, 1978; Junqueira e Carneiro, 1979). Na Figura 13, está mostrado um corte do duodeno de rato, após 23 dias na dieta de feijão cru, notando-se zonas de necrose e colapso das vilosidades, havendo aglomerados de células de revestimento necrosadas (zonas escuras), separadas do corpo da vilosidade, com conseqüente exposição da lâmina própria. A Figura 14 mos-

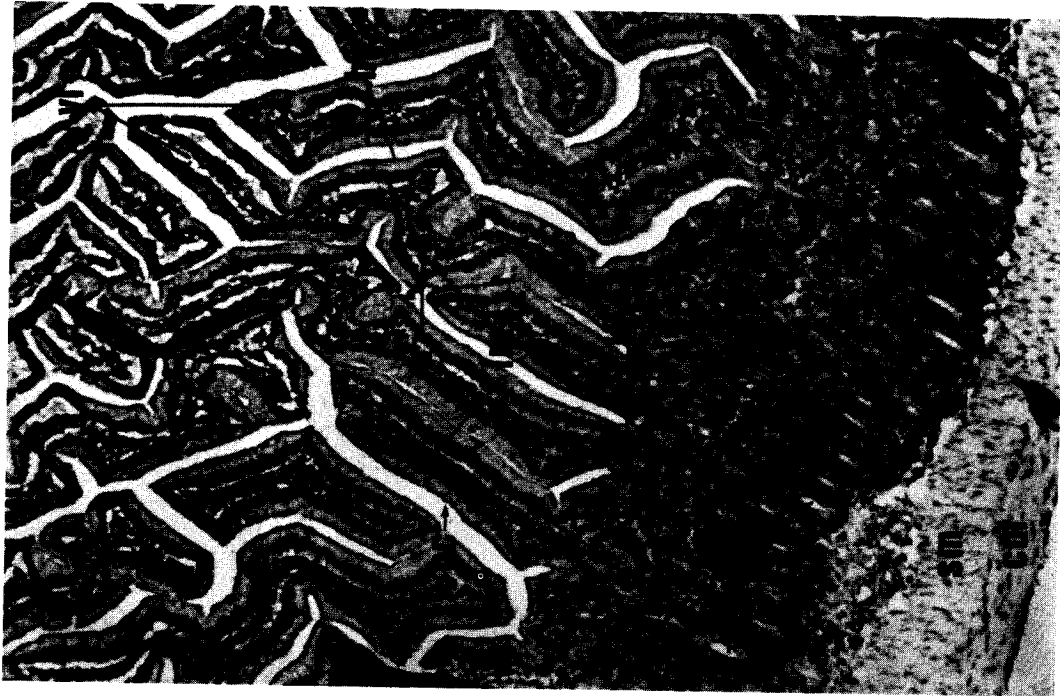


FIGURA 9. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína; vl-vilosidades, be-bordo estriado, ca-células absortivas, cc-células caliciformes, lk-glândulas de Lieberkühn, lm-lâmina própria, sm-submucosa, cm-camada muscular. HE, 87X.

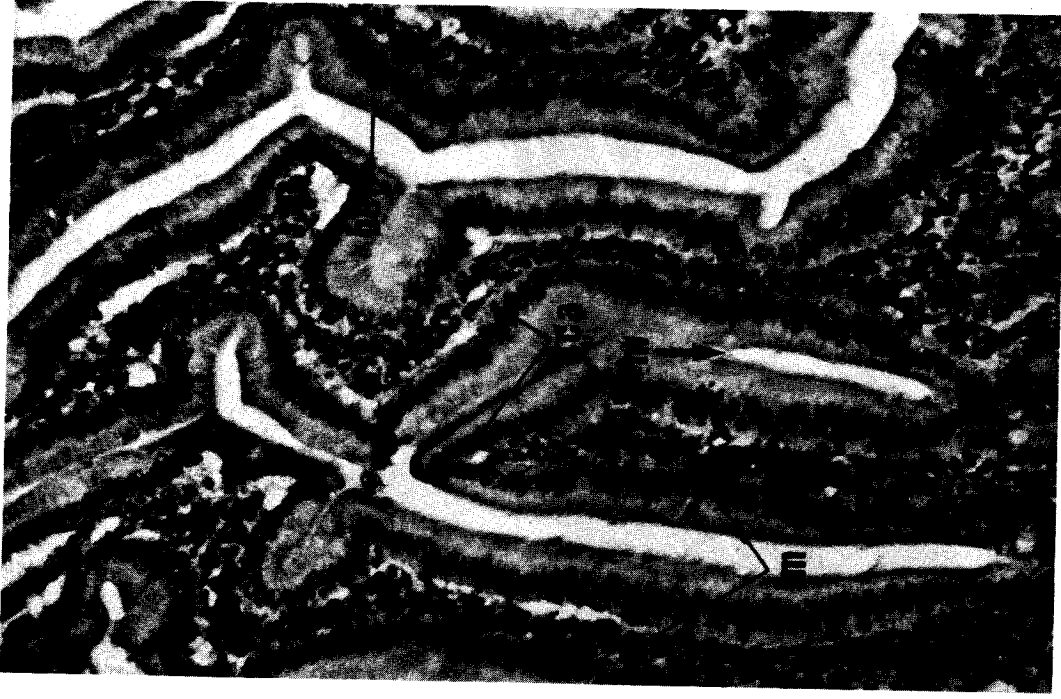


FIGURA 10. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína (detalhe ampliado da figura 9); be-bordo estriado, cc-célula caliciforme, lm-lâmina própria, m-muco, nca-núcleo das células absortivas. HE, 220X.

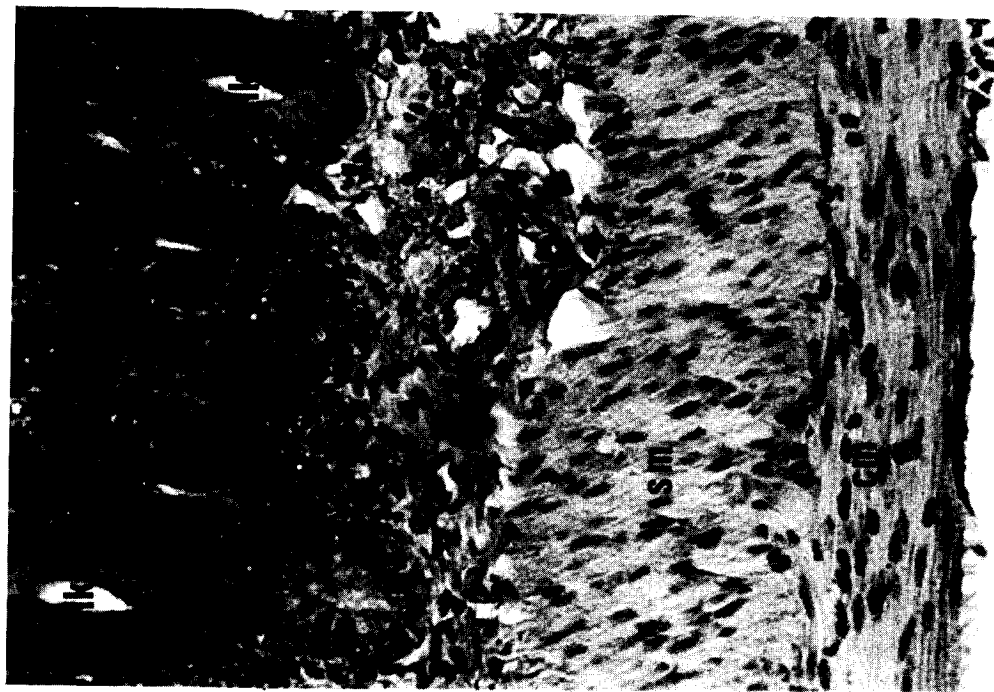


FIGURA 11. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína (detalhe ampliado da Fig. 9); lk-giândulas de Lieberkühn, sm-submucosa, cm-camada muscular. HE, 220X.



FIGURA 12. Corte histológico do duodeno de rato, após 34 dias em dieta de caseína; be-bordo estriado, cc- células caliciformes. PAS, 220X.

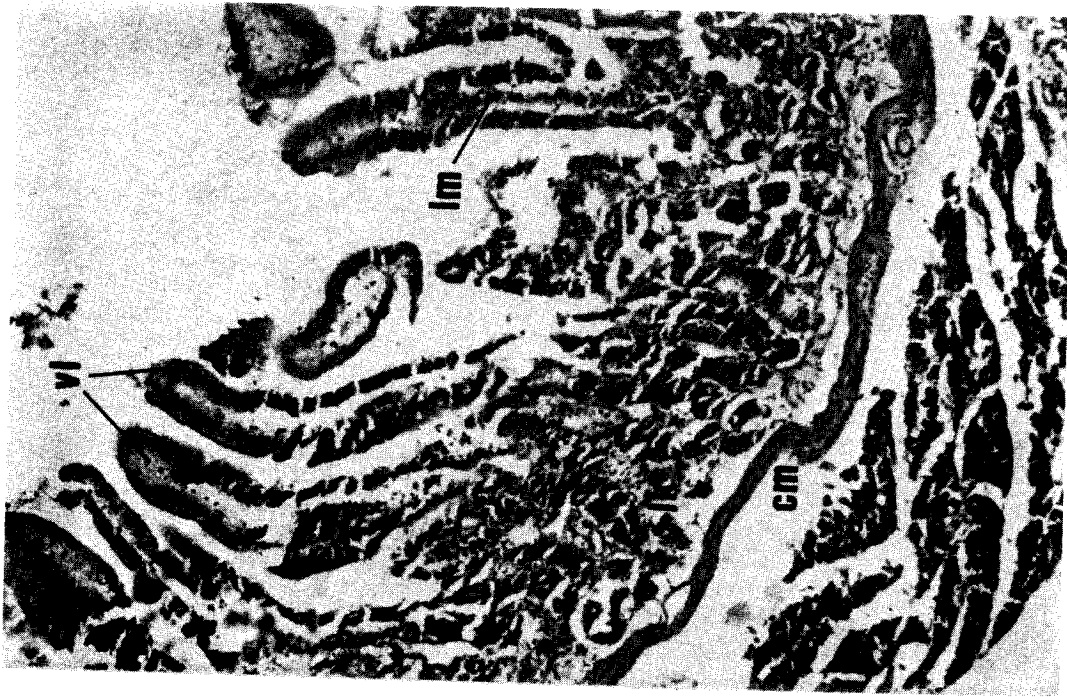


FIGURA 13. Corte histológico do duodeno de rato, após 23 dias em dieta de feijão cru; vl-vilosidades, lk-glândulas de Lieberkühn, lm-lâmina própria, cm-camada muscular. HE, 87X.

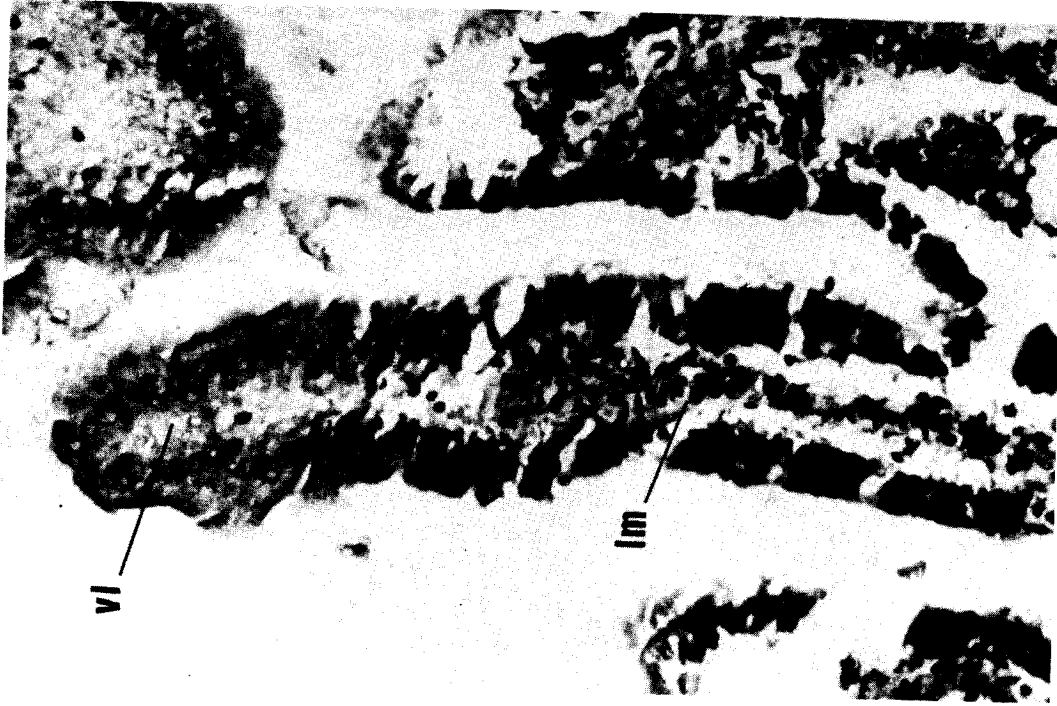


FIGURA 14. Corte histológico do duodeno de rato, após 23 dias em dieta de feijão cru (detalhe ampliado da Fig. 13); vl-vilosidades, lm-lâmina própria. HE, 282X.

tra um detalhe aumentado da Figura 13, vendo-se uma total descontinuidade do bordo estriado da vilosidade, assim como praticamente o desaparecimento das células caliciformes e de muco. Os efeitos da dieta de feijão cru aparecem ainda mais deletérios na Figura 15, onde atingiram a camada muscular e é observado o desaparecimento das vilosidades, restando apenas remanescentes da lâmina própria. Permanecem ainda visíveis as porções tortuosas das glândulas de Lieberkühn, próximas à camada muscular. O lúmen intestinal tem como conteúdo, grande quantidade de restos teciduais das zonas necrosadas das vilosidades. Os cortes histológicos dos jejunos dos ratos em caseína e em feijão cru, apresentaram, respectivamente, aspectos morfológicos semelhantes aos já descritos. Os cortes dos intestinos delgados dos ratos recuperados em dieta comercial, apresentaram características normais.

4.6. Resultados obtidos no Ensaio B

As médias dos resultados experimentais, com os respectivos desvios padrões, referentes as variações de peso, digestibilidades e valores biológicos, estão dispostos na Tabela 8, onde verifica-se que tanto as operações de anestesia e injeção da Gly ^{14}C , como a adição de 2,5% de fibra, não modificaram a utilização da caseína pelos ratos. As variações de peso ficaram dentro do esperado. A digestibilidade verdadeira da caseína comercial, está de acordo com aquela encontrada por Liener e Thompson (1980) e o valor biológico semelhante ao relatado por Lee *et alii* (1978). As digestibilidades do feijão, cozido e cru, mostraram valores levemente inferiores aos encontrados para o feijão utilizado no balanço anterior e idêntico aumento, de 40%, devido ao tratamento térmico.

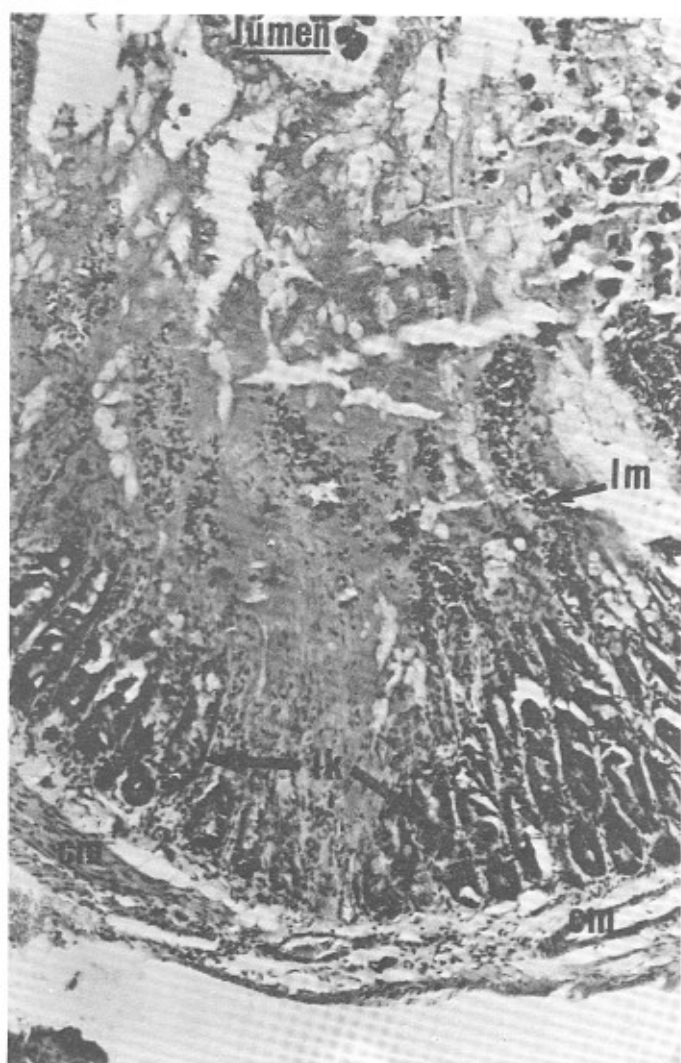


FIGURA 15. Corte histológico do duodeno de rato, após 23 dias em dieta de feijão cru; lk-glândulas de Lieberkühn, lm-lâmina própria, cm-camada muscular. HE. 87X

TABELA 8. Variação de peso, digestibilidade e valor biológico, em ratos¹ Wistar previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ¹⁴C, submetidos a balanço de nitrogênio de 4 dias, em dieta de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, safra do inverno de 1984, ca-seína e aptotética.

DIETA	VARIACÃO PESO (g)	N ingerido (mg)	N fecal (mg)	N urinário (mg)	DIGESTIBILIDADE (%)		VALOR BIOLÓGICO (%)	
					Aparente	Verdadeira	Aparente	Verdadeiro
Caseína (Controle) ²	18,3±0,4	705,2±0,0	48,0±5,6	214,0±30,5	93,20±0,79 ^a	95,19±0,79 ^a	67,45±4,37 ^a	78,94±4,38 ^a
Caseína	22,7±3,4	797,5±76,0	49,3±9,0	224,9±82,2	93,76±1,43 ^a	95,53±1,34 ^a	70,46±7,56 ^a	80,57±8,42 ^a
Caseína + 2,5% fibra	20,2±4,3	746,4±87,3	54,6±13,5	221,2±74,3	92,53±2,54 ^a	94,42±2,36 ^a	68,54±6,11 ^a	79,56±7,29 ^a
Feijão cozido	8,8±1,3	630,5±26,6	221,0±6,6	196,6±43,2	64,92±1,44 ^b	67,14±1,37 ^b	51,80±11,69 ^b	70,56±10,87 ^a
Feijão cru	-2,2±1,0	381,6±8,7	292,7±52,2	124,9±24,4	23,17±14,85 ^c	26,84±14,80 ^c	negativo	46,40±9,03 ^b
Aptotética	-0,9±1,1	31,1±3,0	14,0±7,2	72,5±50,1	-	-	-	-

1. Os resultados representam a média para 3 ou 4 ratos; valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem (P<0,05);

2. Ratos que não sofreram anestesia nem injeção de Gly ¹⁴C.

O feijão cozido apresentou um valor biológico verdadeiro acima da faixa de médias revisada por Tobin e Carpenter (1978), como já constatado por Sgarbieri *et alii* (1983) para este cultivar, não diferindo significativamente ($P < 0,05$) do valor biológico da caseína.

Visto que o elemento radioativo da glicina utilizada era o carbono e não o nitrogênio, determinou-se as correlações entre as radioatividades das fezes e urinas e as quantidades de carbono e nitrogênio excretadas pelos ratos nas dietas utilizadas. As Figuras 16 e 17 mostram, respectivamente, que as radioatividades das urinas apresentaram correlações lineares, positivas, moderadas e assemelhadas com o carbono, $r = 0,5967^*$ ($P < 0,05$), e com o nitrogênio, $r = 0,5433^*$ ($P < 0,05$), excretados na urina. A radioatividade das fezes mostrou correlação linear, positiva e moderada, $r = 0,8629^{**}$ ($P < 0,01$), com o carbono (Figura 18) e correlação linear, positiva e forte, $r = 0,9564^{**}$ ($P < 0,01$), com o nitrogênio (Figura 19) excretado nas fezes. Assim, o carbono radioativo ligado ao nitrogênio representava no caso das urinas e, com maior fidelidade, no caso das fezes, a radioatividade que, por sua vez, indicava excreção de nitrogênio endógeno.

A Tabela 9 mostra que as médias das radioatividades das fezes diferiram ($P < 0,05$) entre as diversas dietas, com exceção daquelas dos ratos em dietas de caseína e caseína contendo 2,5% de fibra. Este resultado demonstrou que a excreção de nitrogênio endógeno fecal diferiu entre os ratos nas demais dietas, indicando a inadequação da dieta aprotéica para a correção da digestibilidade aparente, principalmente no caso dos ratos em dieta contendo proteínas de feijão, em que a radioatividade excretada foi cerca de 5 vezes maior, na dieta de feijão cozido e 10 vezes maior, na dieta de feijão cru. O fato da adição de celulose à dieta de caseína não ter alterado a excreção de nitrogênio endógeno fecal dos ra-

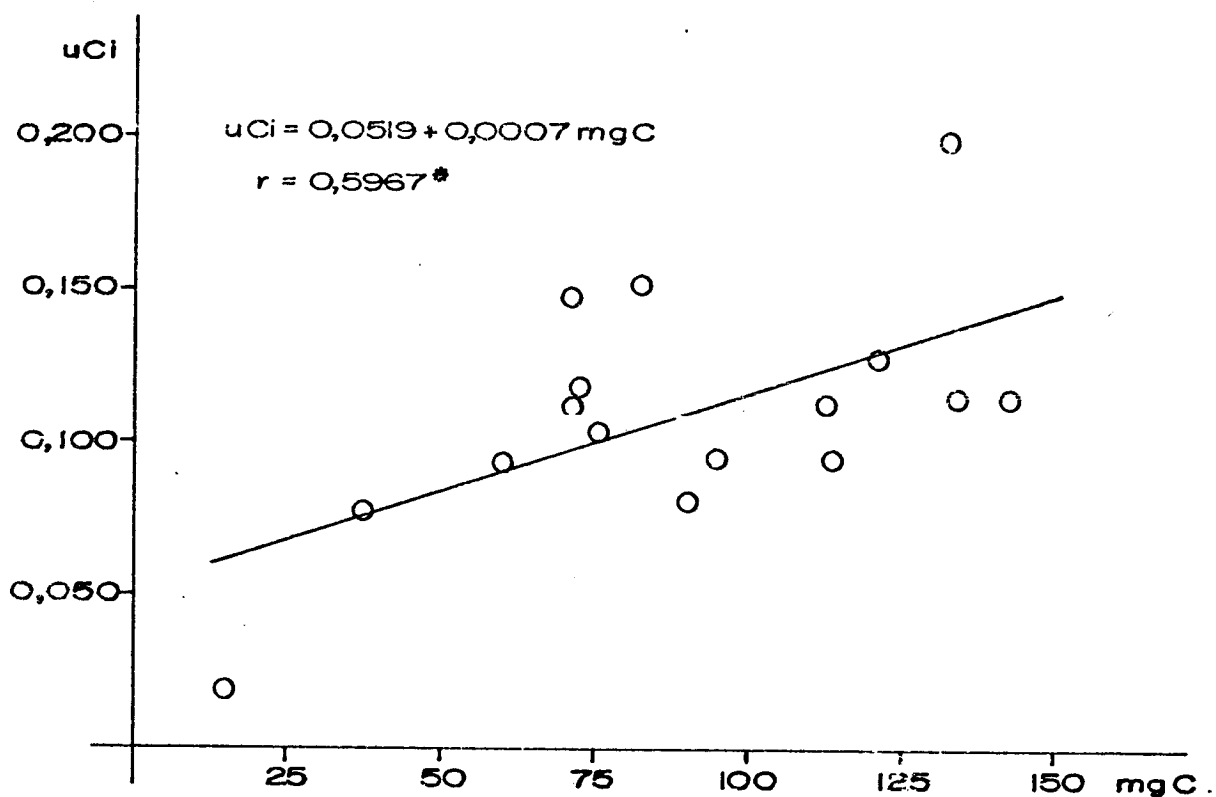


FIGURA 16. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das urinas e a excreção urinária de carbono (mg) de ratos Wistar injetados com Gly ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína e aprotéica.

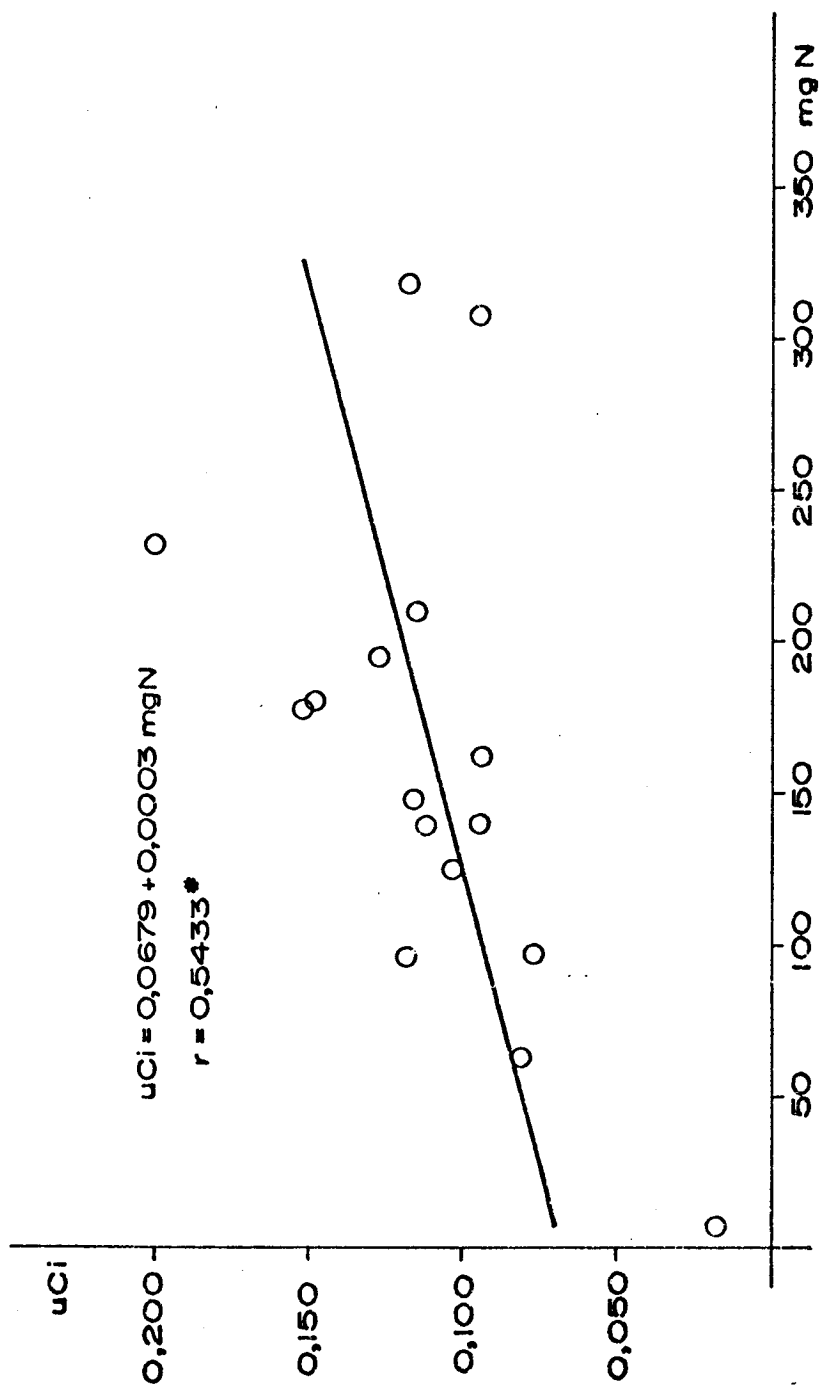


FIGURA 17. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das urinas e a excreção urinária de nitrogênio (mg) de ratos Wistar injetados com $\text{Gly } ^{14}\text{C}$, após balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína e aprotéica.

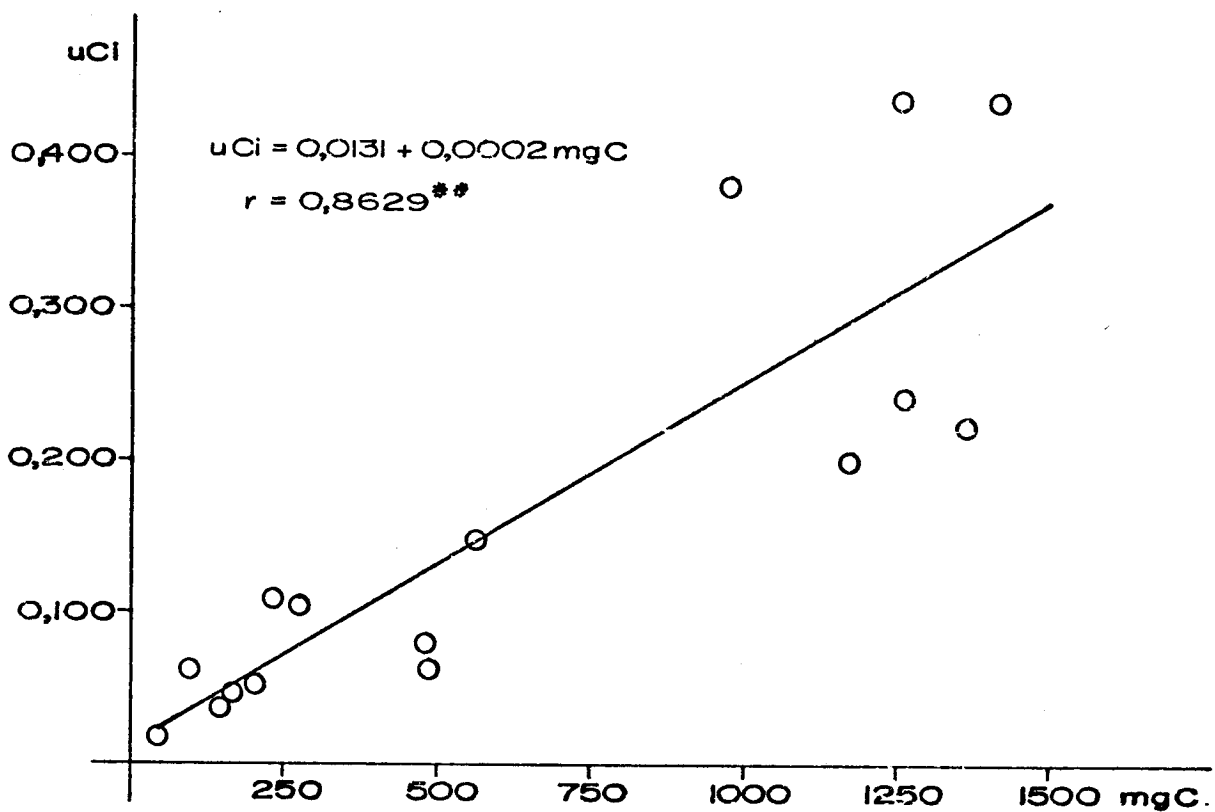


FIGURA 18. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das fezes e a excreção fecal de carbono (mg) de ratos Wistar injetados com Gly ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 86, caseína e aprotéica.

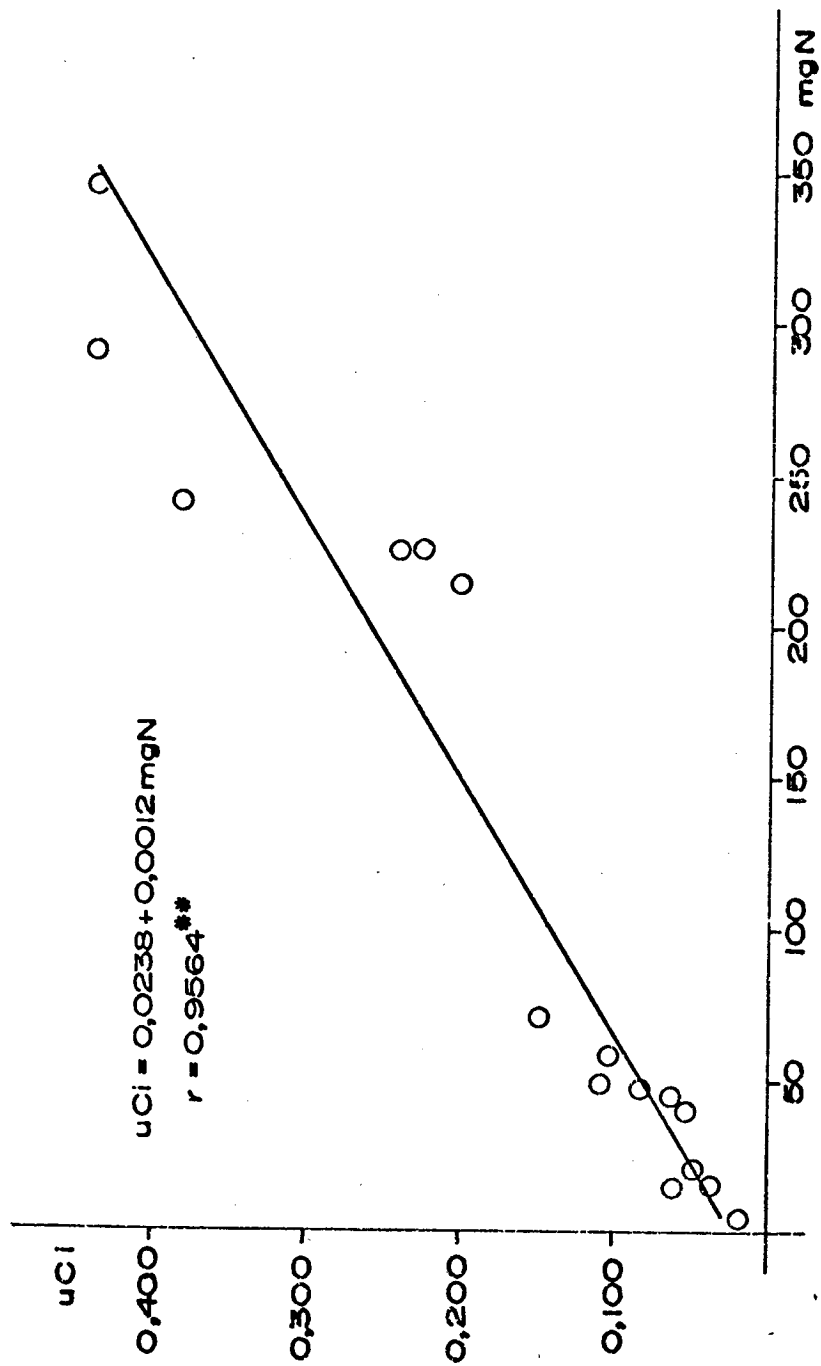


FIGURA 19. Regressão linear para a relação entre a radioatividade (μCi) das fezes e a excreção fecal de nitrogênio (mg) de ratos Wistar injetados com Gly ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína e aptotética.

TABELA 9. Radioatividade das fezes e urinas de ratos¹ Wistar previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ¹⁴C, colocados em balanço de nitrogênio de 4 dias, em dieta de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, safra do inverno de 1984, caseína e aprotéica.

DIETA	RADIOATIVIDADE (μCi)	
	FEZES	URINAS
Aprotéica	0,041±0,019 ^a	0,080±0,044 ^a
Caseína	0,089±0,031 ^b	0,111±0,017 ^a
Caseína + 2,5% fibra	0,097±0,045 ^b	0,132±0,032 ^a
Feijão cozido	0,222±0,020 ^c	0,144±0,049 ^a
Feijão cru	0,419±0,033 ^d	0,094±0,018 ^a

1. Os resultados representam a média para 3 ou 4 ratos; valores na mesma coluna assinalados com a mesma letra, não diferem (P<0,05).

tos encontra-se de acordo com o descrito por Araya *et alii* (1974), que a adição de celulose, embora aumente o peso das fezes de ratos em dieta aprotéica, reduz o teor de nitrogênio das mesmas, mantendo constante a excreção de nitrogênio total. Por outro lado, as médias das radioatividades das urinas dos ratos nas diversas dietas, não diferiram ($P < 0,05$), o que demonstrou a adequação da dieta aprotéica para correção do nitrogênio endógeno urinário, visto que a excreção não variou entre as dietas. Verificou-se a existência de correlação linear, negativa e forte, entre a digestibilidade aparente (DIG) e a radioatividade, em microcuries (μCi), das fezes dos ratos nas dietas de caseína e feijão, definida pela equação, $\text{DIG}(\%) = 112,2481 - 210,9776 \mu\text{Ci}$, com $r = -0,9805^{**}$, $P < 0,01$ (Figura 20), demonstrando a influência da excreção de nitrogênio endógeno fecal nos valores de digestibilidade. O valor biológico aparente mostrou correlação linear, negativa e moderada, $\text{VB}(\%) = 89,6402 - 201,7573 \mu\text{Ci}$, com $r = -0,8990^{**}$, $P < 0,01$, com a radioatividade das fezes (Figura 21), mas não apresentou correlação significativa, $r = -0,0839^{\text{ns}}$ ($P < 0,05$) com a radioatividade das urinas.

Os resultados do experimento de coleta diária das fezes estão apresentados na Figura 22, onde verificou-se que a radioatividade acumulada das fezes do rato em dieta de feijão cozido, embora 2 a 2,5 vezes maior, ao longo do balanço, mostrou uma mesma tendência à estabilização do que as dos ratos em dieta de caseína. Já o rato em dieta de feijão crú, apresentou uma liberação inicial de radioatividade fecal baixa, provavelmente devida ao lento esvaziamento do conteúdo estomacal (Sgarbieri *et alii*, 1982a), o que resultou numa quantidade de fezes pequena nas primeiras 24 horas do experimento, que pode ser observada na Tabela 10, onde também está mostrada a redução das radioatividades específicas das fezes ao longo do balanço. Entretanto, a radioatividade acumulada das fezes

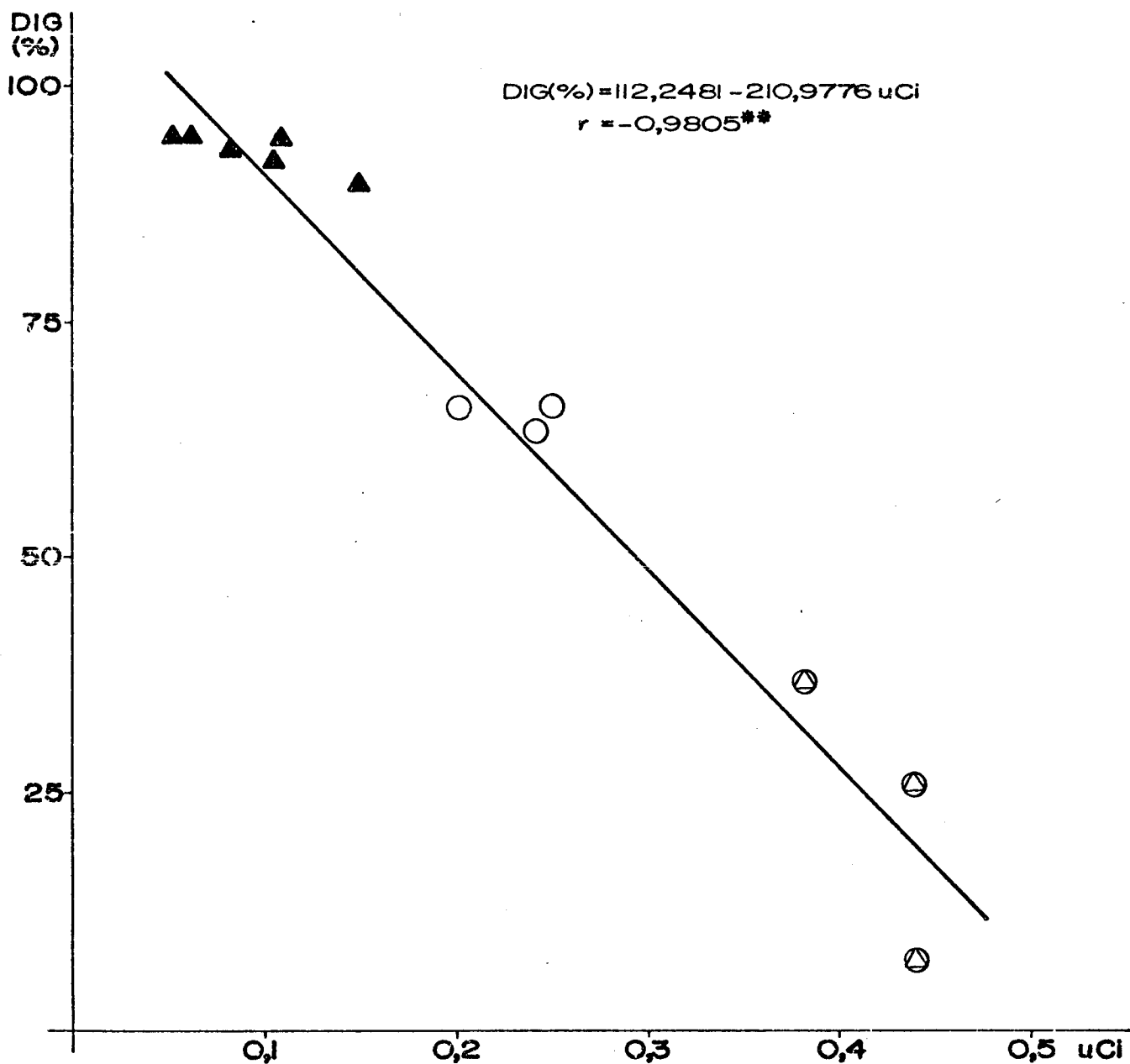


FIGURA 20. Regressão linear para a relação entre a digestibilidade aparente (DIG) das proteínas das dietas e a radioatividade (μCi) das fezes de ratos Wistar, previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ^{14}C , após balanço de nitrogênio de 4 dias em dietas de caseína (▲), feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cru (⊕) e cozido (○).

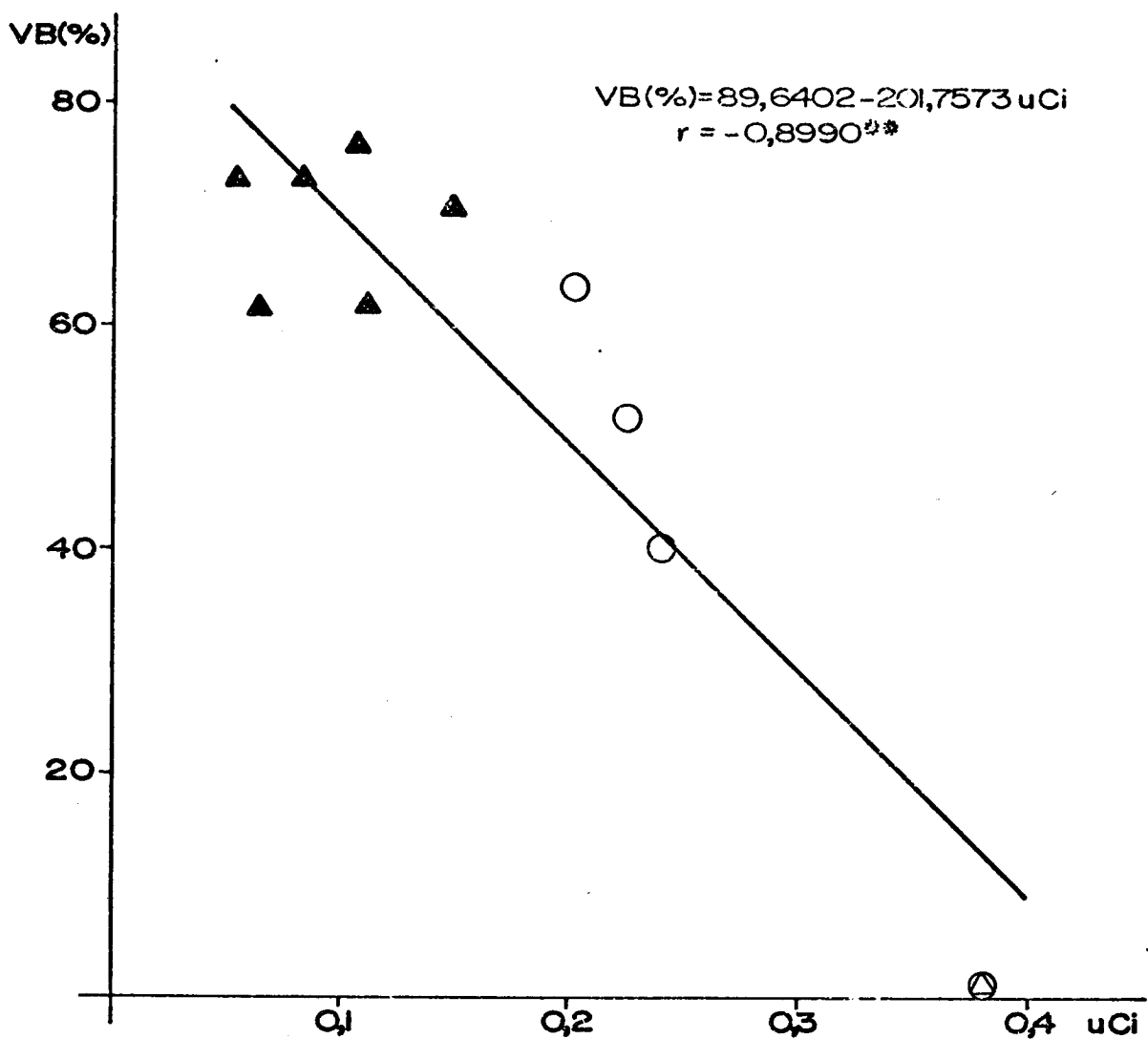


FIGURA 21. Regressão linear para a relação entre o valor biológico aparente (VB) das proteínas das dietas e a radioatividade (μCi) das fezes de ratos Wistar, previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ^{14}C , após balanço de 4 dias em dietas de caseína (▲), feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cru (⊙) e cozido (○); os outros ratos nas dietas de feijão cru apresentaram VB negativo e não foram considerados no cálculo da regressão.

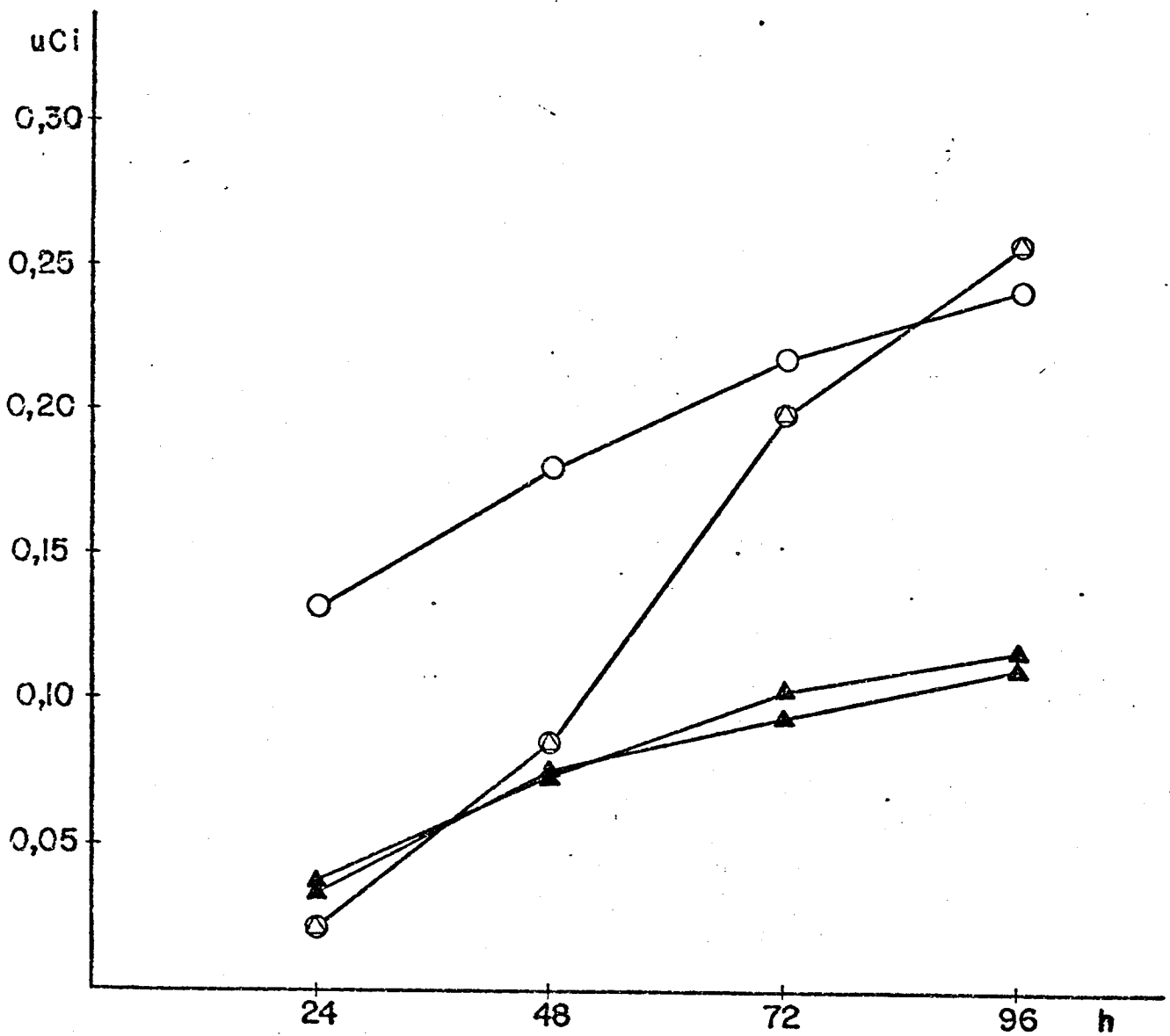


FIGURA 22. Radioatividade acumulada (μCi) das fezes de ratos Wistar, adrede jejuados e injetados com glicina ^{14}C , ao longo de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de caseína(▲), feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cru (◐) e cozido (○).

TABELA 10. Peso (g) e radioatividade específica das fezes ($\mu\text{Ci/g}$), em cada período de 24 horas, de ratos Wistar adrede jejuados e injetados com glicina ^{14}C , em balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de caseína e feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, safra das águas de 1983.

RATO	DIETA	24 h		48 h		72 h		96 h	
		g	$\mu\text{Ci/g}$	g	$\mu\text{Ci/g}$	g	$\mu\text{Ci/g}$	g	$\mu\text{Ci/g}$
1 ¹	Caseína	0,35	nd ²	0,44	nd	0,22	nd	0,27	nd
2	Caseína	0,33	0,097	0,47	0,103	0,34	0,055	0,38	0,044
3	Caseína	0,28	0,134	0,38	0,095	0,51	0,056	0,36	0,037
4	Feijão cozido	1,42	0,092	1,64	0,029	1,81	0,021	1,38	0,018
5	Feijão cru	0,20	0,108	0,80	0,078	2,39	0,047	1,81	0,032

1. Rato controle, sem aplicação de Gly ^{14}C ;

2. Não detectada.

do rato em feijão cru, aumentou continuamente, não apresentando tendência à estabilização, o que pode ser atribuído a lesões progressivas das vilosidades intestinais dos ratos pela ação das lectinas do feijão, conforme ao relatado em sub-seções anteriores, com conseqüente aumento de material celular radioativo nas fezes. As variações de peso, digestibilidades e valores biológicos encontrados, através do balanço de nitrogênio, referentes a este experimento, acham-se dispostos na Tabela 11, onde observa-se que os valores das digestibilidades e valores biológicos deste feijão, da safra das águas de 1983, diferiram daqueles encontrados para o feijão proveniente da safra de inverno de 1984. A influência da época de colheita na quantidade e qualidade protéica do feijão já foi demonstrada por Lantz *et alii* (1958).

4.7. Resultados obtidos no Ensaio C

Os valores encontrados para a digestibilidade e o valor biológico, com base no balanço de nitrogênio total, encontram-se dispostos na Tabela 12. Para o feijão cozido, a digestibilidade e o valor biológico, estão dentro da faixa de variação apresentada na revisão de Tobin e Carpenter (1978). Observou-se novamente um aumento, devido ao tratamento térmico, dos valores da digestibilidade do feijão integral e do extrato protéico, como já relatado na literatura (Jaffé, 1950; Antunes e Sgarbieri, 1980; Liener e Thompson, 1980), assim como dos respectivos valores biológicos, sendo particularmente notável no caso do feijão integral. A utilização do extrato protéico autoclavado, apresentou também um aumento absoluto de cerca de 15% da digestibilidade, semelhante ao encontrado por Antunes e Sgarbieri (1980), e similar àquele do valor

TABELA 11. Variação de peso, digestibilidade e valor biológico em ratos Wistar previamente jejuados e injetados via intraperitoneal com glicina ^{14}C , submetidos a balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv Carioca 80, safra das águas de 1983, ca-seína e aprotéica.

RATO	DIETA	VARIACÃO PESC (g)	N ingerido (mg)	N fecal (mg)	N urinário (mg)	DIGESTIBILIDADE (%)		VALOR BIOLÓGICO (%)	
						APARENTE	VERDADEIRA	APARENTE	VERDADEIRO
1 ¹	Caseína	15,5	839,5	37,4	307,8	95,54	97,21	61,62	71,17
2	Caseína	20,5	888,4	51,3	316,8	94,23	95,80	62,16	71,30
3	Caseína	12,5	872,1	59,8	305,6	93,15	94,75	62,38	71,79
4	Feijão cozido	10,5	955,3	225,7	399,5	76,37	77,84	45,23	56,02
5	Feijão cru	-10,0	388,8	350,7	207,9	9,80	13,40	negativo	negativo
	Aprotéica ²	- 0,9	31,1	14,0	72,5	-	-	-	-

1. Rato controle, sem aplicação de Gly ^{14}C ;

2. Utilizados os dados do balanço anterior (Tabela 8), que representam a média para 4 ratos.

TABELA 12. Variação de peso, digestibilidade e valor biológico, em ratos¹ Wistar previamente jejuados e colocados em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, caseína e aptotética, em balanço de nitrogênio total de 4 dias.

DIETA	VARIACÃO PESO (g)	N ingerido (mg)	N fecal (mg)	N urinário (mg)	DIGESTIBILIDADE (%)		VALOR BIOLÓGICO (%)	
					Aparente	Verdadeira	Aparente	Verdadeira
Caseína	21,7±3,3	752,2±62,5	49,5± 2,9	280,0±29,5	93,41±0,29 ^a	95,27±0,21 ^a	60,07±4,17 ^{ab}	71,01±3,86 ^a
Caseína + 2,5% fibra	17,3±0,3	775,7±76,2	58,7± 0,2	254,2±32,0	92,39±0,72 ^a	94,20±0,54 ^a	64,45±4,19 ^a	75,12±3,94 ^a
Feijão integral cozido	11,0±2,7	626,5±75,5	183,7±21,7	274,7±25,3	70,66±1,15 ^b	72,92±1,14 ^b	37,77±2,90 ^c	55,74±2,04 ^b
Feijão integral cru	-3,6±2,1	416,1±73,5	353,8±75,9	182,7±45,7	15,17±8,80 ^c	18,61±8,94 ^c	negativo	negativo
Extrato protéico autoclavado	9,8±2,5	615,8±82,7	92,8±13,0	252,5±46,3	85,43±4,09 ^a	87,60±3,80 ^a	54,02±10,29 ^b	68,10±8,50 ^{ac}
Extrato protéico cru	-2,2±2,0	463,1±85,8	237,5±48,0	161,6±16,6	47,92±11,97 ^d	51,02±11,61 ^d	36,94±2,76 ^c	61,15±7,79 ^{bc}
Aprotética ²	-0,9±1,1	31,1±3,0	14,0±7,2	72,5±50,1	-	-	-	-

1. Os valores representam a média para 3 ou 4 ratos; valores na mesma coluna assinalados com a mesma letra não diferem (P<0,05).

2. Utilizados os dados do balanço anterior (Tabela 8), que representam a média para 4 ratos.

biológico, com relação ao feijão integral cozido. Verificou-se também um aumento absoluto de aproximadamente 33% da digestibilidade, ao utilizar-se o extrato protéico cru, com relação ao feijão integral cru. O valor biológico do extrato protéico cru não diferiu ($P < 0,05$) daquele do feijão cozido e o do extrato protéico autoclavado do valor biológico da caseína. Assim, infere-se daí a existência no feijão integral, de substâncias de provável natureza não-protéica, capazes de interagirem com suas proteínas e/ou com as enzimas digestivas do rato, diminuindo a digestibilidade, à semelhança do relatado na sub-seção 4.1. Com relação ao valor biológico, os resultados sugerem igualmente uma interação mas, neste caso, substâncias não-protéicas do feijão integral seriam capazes de interferirem com a utilização da proteína, ao nível de metabolismo intermediário. Outra hipótese possível, seria de que todo efeito negativo das substâncias interferentes estaria sendo exercido ao nível intestinal, em termos de digestão e absorção, de forma que o "pool" de aminoácidos disponíveis para síntese protéica, seria mais adequado no caso de utilizar-se o extrato protéico. Evans e Bauer (1978) já haviam relatado a existência de substâncias dialisáveis e termorresistentes no feijão, que eram capazes de inibir o crescimento de ratos, quando incorporadas à dieta cujas fontes protéicas eram frações protéicas de feijão autoclavadas. Posteriormente, Sgarbieri *et alii* (1982b) verificaram que a extração das proteínas do feijão, seguida de diálise, eliminava fatores antinutricionais, provavelmente de natureza não-protéica, capazes de interferir com a digestibilidade da proteína e a utilização de aminoácidos. Os ratos mostravam um crescimento maior com a suplementação do isolado protéico com metionina, do que com a do feijão integral, ambos tratados termicamente. Verificou-se, neste balanço, novamente a influência tanto da época como do local de colheita (Lantz *et alii*,

1958), principalmente no valor biológico do feijão, quando comparado com o balanço anterior (Tabela 8).

As digestibilidades e valores biológicos das proteínas do feijão, calculados com base no balanço do excesso de nitrogênio ^{15}N , estão dispostos na Tabela 13. A média de percentagem natural de ^{15}N encontrada foi de $0,380 \pm 0,014\%$, similar à relatada por Goldman, em 1962, de $0,370\%$, *apud* Wang e Willis (1965) e a das dietas, $0,936 \pm 0,020\%$ de excesso de ^{15}N . Tais digestibilidades e valores biológicos foram denominados reais, tanto para diferenciar daqueles aparentes e verdadeiros, como devido a não sofrerem interferência do nitrogênio excretado pelos ratos de origem endógena, dizendo respeito somente à proteína do feijão. Na verdade, os cálculos dos valores determinados pelo balanço do excesso de ^{15}N , equivalem matematicamente a se efetuar as correções das digestibilidades e valores biológicos aparentes, com as excreções endógenas fecais e urinárias reais, cujas médias estão mostradas na Tabela 14 (ver Apêndice 1). O exame da Tabela 13 mostrou que o tratamento térmico ocasionou um aumento absoluto dos valores das digestibilidades, como observado nos balanços anteriores, de 32% para o feijão integral e 26% para o extrato protéico. A extração da proteína aumentou a digestibilidade do feijão cru de 17%, semelhante ao encontrado para a digestibilidade *in vitro*, mostrada na Tabela 4. Para os materiais tratados termicamente, o aumento foi de 11%. Todas estas diferenças foram significativas ($P < 0,05$), valendo portanto, para estes resultados, todas as observações feitas para as diferentes digestibilidades aparentes e verdadeiras obtidas através do balanço de nitrogênio total (Tabela 12). Entretanto, os valores biológicos reais do feijão integral e do extrato protéico, sofreram uma redução com o tratamento térmico, sendo esta última significativa a nível de 5%. Esta redução do valor biológico do extrato

TABELA 13. Digestibilidade e valor biológico reais de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, obtidos através de balanço do excesso de nitrogênio 15 de 4 dias, em ratos¹ Wistar previamente jejuados.

DIETA	¹⁵ N ingerido (mg)	¹⁵ N fecal (mg)	¹⁵ N urinário (mg)	DIGESTIBILIDADE (%)	VALOR BIOLÓGICO (%)
Feijão integral cozido	5,9±0,7	1,3±0,2	1,3±0,2	78,61±0,72 ^a	71,32±0,81 ^a
Feijão integral cru	3,9±0,7	2,1±0,4	0,4±0,1	46,38±3,19 ^b	77,03±6,01 ^{ab}
Extrato protéico autoclavado	6,2±0,8	0,6±0,1	1,1±0,2	89,98±2,76 ^c	80,30±4,10 ^b
Extrato protéico cru	4,2±0,8	1,5±0,3	0,3±0,1	63,42±7,50 ^d	88,29±1,30 ^c

1. Os resultados representam a média para 3 ou 4 ratos; valores na mesma coluna assinalados com a mesma letra não diferem (P<0,05).

TABELA 14. Contribuição percentual¹ e quantidade de nitrogênio endógeno excretado nas fezes e urinas de ratos² Wistar adrede jejuados, colocados em dietas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, em balanço de nitrogênio de 4 dias.

DIETA	FEZES		URINAS	
	Porcentagem	Quantidade (mg)	Porcentagem	Quantidade (mg)
Feijão integral cozido	27,00±4,09 ^a	49,4± 7,5 ^{ab}	48,70±1,99 ^a	133,5±8,1 ^a
Feijão integral cru	36,50±4,79 ^b	130,7±40,0 ^c	75,87±4,00 ^b	138,5±35,9 ^a
Extrato protéico autoclavado	31,20±1,04 ^{ab}	29,0± 4,5 ^b	54,73±0,82 ^a	138,1±24,6 ^a
Extrato protéico cru	29,51±2,28 ^a	70,0±13,8 ^a	78,86±3,64 ^b	127,0± 8,4 ^a

1. Com relação ao nitrogênio total das fezes e urinas.

2. Os resultados representam a média para 3 ou 4 ratos; valores na mesma coluna assinalados com a mesma letra não diferem (P<0,05).

protéico, resultante da autoclavagem, pode ser atribuída ao de crêscimo da biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (Osner e Johnson, 1968; Antunes e Sgarbieri, 1980). A utilização do extrato protéico, por outro lado, apresentou um aumento absoluto de cerca de 10% com relação ao feijão integral, tanto no estado cru como tratado termicamente.

Confrontando-se as Tabelas 12 e 13, pode ser observado que os valores de digestibilidade e o valor biológico, aparentes e verdadeiros, obtidos através do balanço de nitrogênio total, foram inferiores àqueles reais, obtidos a partir do balanço do excesso de nitrogênio 15. Este fato demonstrou que, no caso de proteínas de feijão, os métodos convencionais de cálculo da digestibilidade, *in vivo* e *in vitro* (Tabela 4), assim como do valor biológico, tendem a subestimar os resultados encontrados para estas avaliações de qualidade protéica.

O exame da Tabela 14 mostra que, no tocante às fezes, as percentagens de nitrogênio endógeno do nitrogênio total excretado pelos ratos, diferiram ($P < 0,05$) devido ao tratamento térmico no caso do feijão e o isolamento da proteína alterou esta percentagem, quando em estado cru. No entanto, as quantidades excretadas de nitrogênio endógeno fecal, apresentaram variações pronunciadas entre as dietas, sendo significativamente maiores para os ratos nas dietas preparadas com feijão integral e extrato protéico crus. O tratamento térmico reduziu esta excreção em ambos os casos, mas o isolamento da proteína somente no estado cru. Tendo em vista estes resultados, procurou-se determinar as relações existentes entre a digestibilidade aparente (DIG), com a percentagem e a quantidade (mg) de nitrogênio endógeno fecal (NEF). Encontrou-se, respectivamente, uma relação exponencial, negativa e moderada, definida pela equação, $DIG(\%) = 3707,7379 \cdot e^{-0,1451 NEF(\%)}$, com $r = -0,7525^{**}$, $P < 0,01$ (Fi

gura 23), e uma relação logarítmica, negativa e forte, $DIG(\%) = 242,0260 - 46,8251 \ln NEF(mg)$, com $r = -0,9621^{**}$ $P < 0,01$ (Figura 24). Ver Apêndice 2, onde está explicada a maneira como foram escolhidas as correlações adequadas. O valor biológico aparente (VB) apresentou correlação logarítmica, negativa e moderada com a quantidade de NEF (mg), cuja equação foi $VB(\%) = 125,1911 - 21,7654 \ln NEF(mg)$, $r = -0,7979^{**}$, $P < 0,01$ (Figura 25). Demonstrou-se, desta forma, que a excreção fecal de nitrogênio endógeno do rato, constitui um fator importante na redução dos valores da digestibilidade e valor biológico aparentes das proteínas do feijão. Em se tratando da excreção urinária, a Tabela 14 mostra que o tratamento térmico reduziu as percentagens de nitrogênio endógeno urinário, para o feijão integral e o extrato protéico, e o isolamento da proteína não influenciou nas mesmas. As quantidades de nitrogênio endógeno urinário excretadas não diferiram entre as dietas ($P < 0,05$), o que ficou em concordância com os resultados encontrados para as radioatividades das urinas, dispostas na Tabela 9 anterior. Assim, o valor biológico aparente não mostrou relação significativa com as percentagens, nem com as quantidades de nitrogênio endógeno urinário, com $r = -0,1660^{ns}$, $P < 0,05$, e $r = -0,1481^{ns}$, $P < 0,05$, respectivamente.

Nas dietas contendo feijão integral ou extrato protéico cru, dentre os fatores que estimulam a excreção de nitrogênio endógeno fecal, encontram-se as lectinas, pela sua ação de descamação das células epiteliais intestinais, já reportada ao longo deste trabalho, e os inibidores de enzimas pancreáticas, pelo estímulo que exercem à produção de secreções enzimáticas digestivas (Green e Lyman, 1972; Liener, 1979). Em dietas contendo feijão cozido ou extrato protéico autoclavado, em que estes fatores antinutricionais foram inativados, as causas que estimulam o rato a uma maior excreção endógena fecal, ainda não são conhecidas.

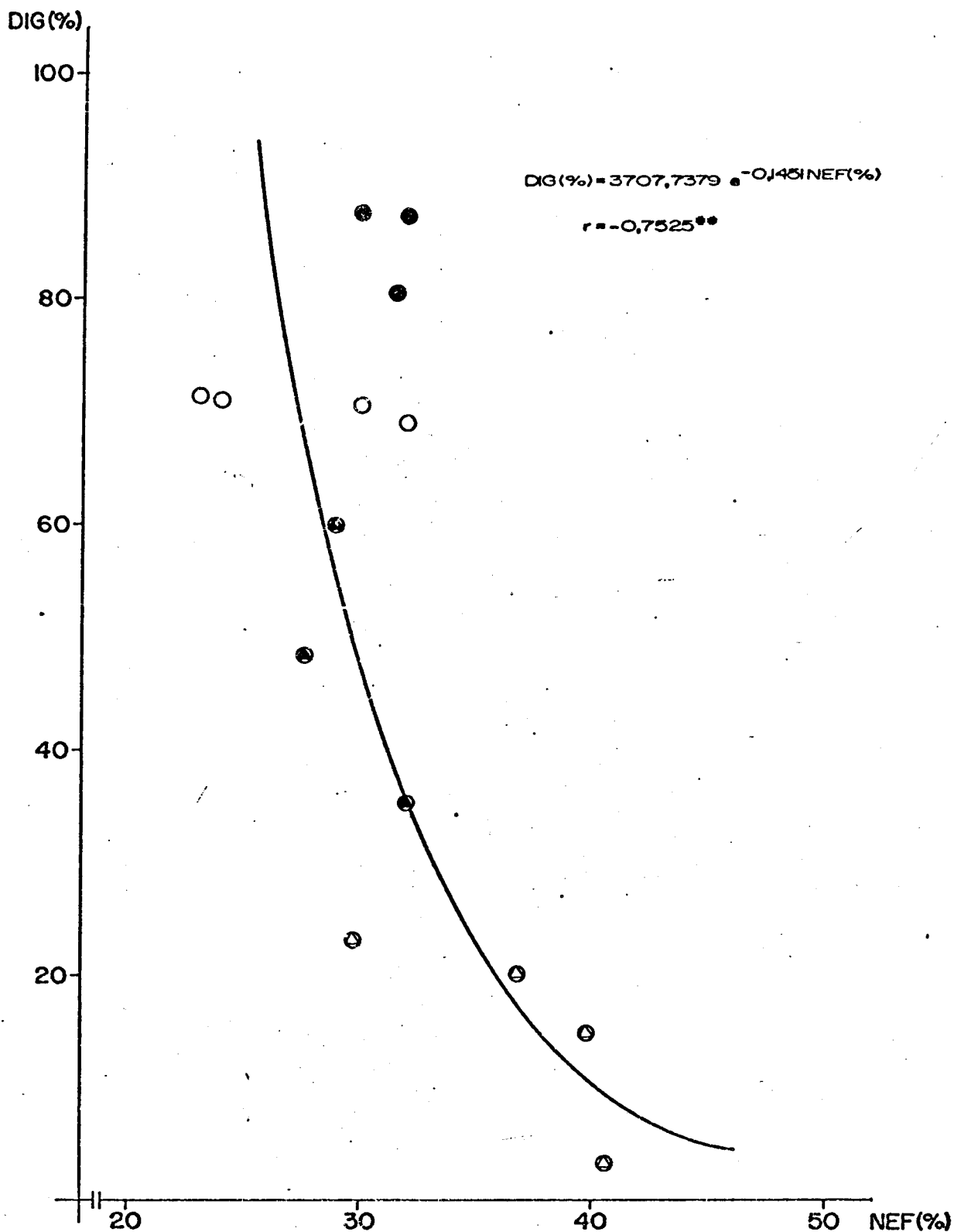


FIGURA 23. Regressão exponencial para a relação entre a digestibilidade aparente (DIG) da proteína do feijão Carioca 80 (*P. vulgaris*), integral cru (△), cozido (○) e como extrato protéico cru (▲) e autoclavado (●), e a percentagem de nitrogênio endógeno fecal (NEF) de ratos Wistar, após 4 dias de balanço.

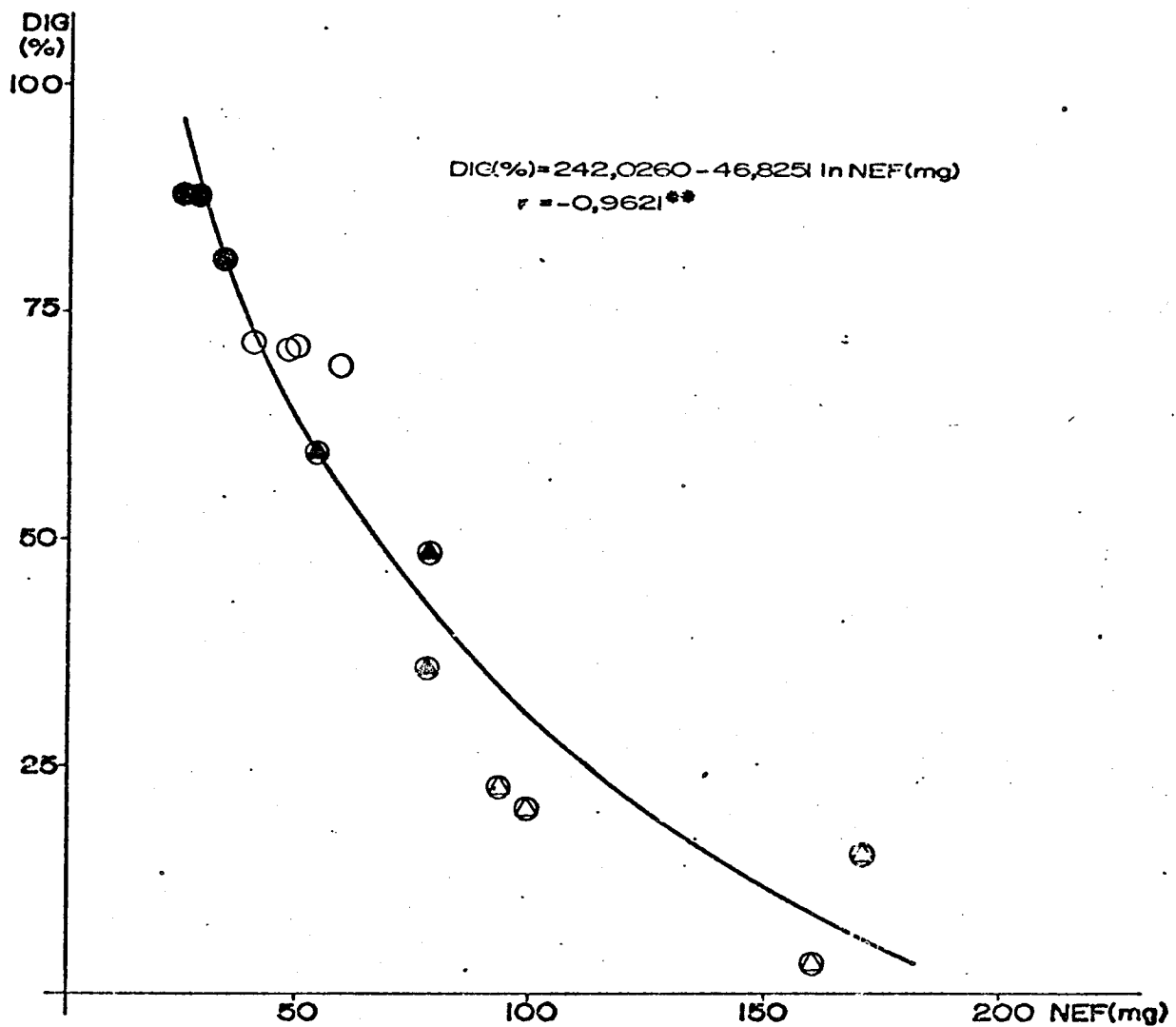


FIGURA 24. Regressão logarítmica para a relação entre a digestibilidade aparente (DIG) de proteína de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, integral e como extrato protéico, cru e cozido, e a quantidade (mg) de nitrogênio endógeno fecal (NEF) real de ratos Wistar, previamente jejuados e mantidos em balanço de nitrogênio de 4 dias; feijão integral cru (⊙), feijão integral cozido (○), extrato protéico cru (▲), extrato protéico autoclavado (●).

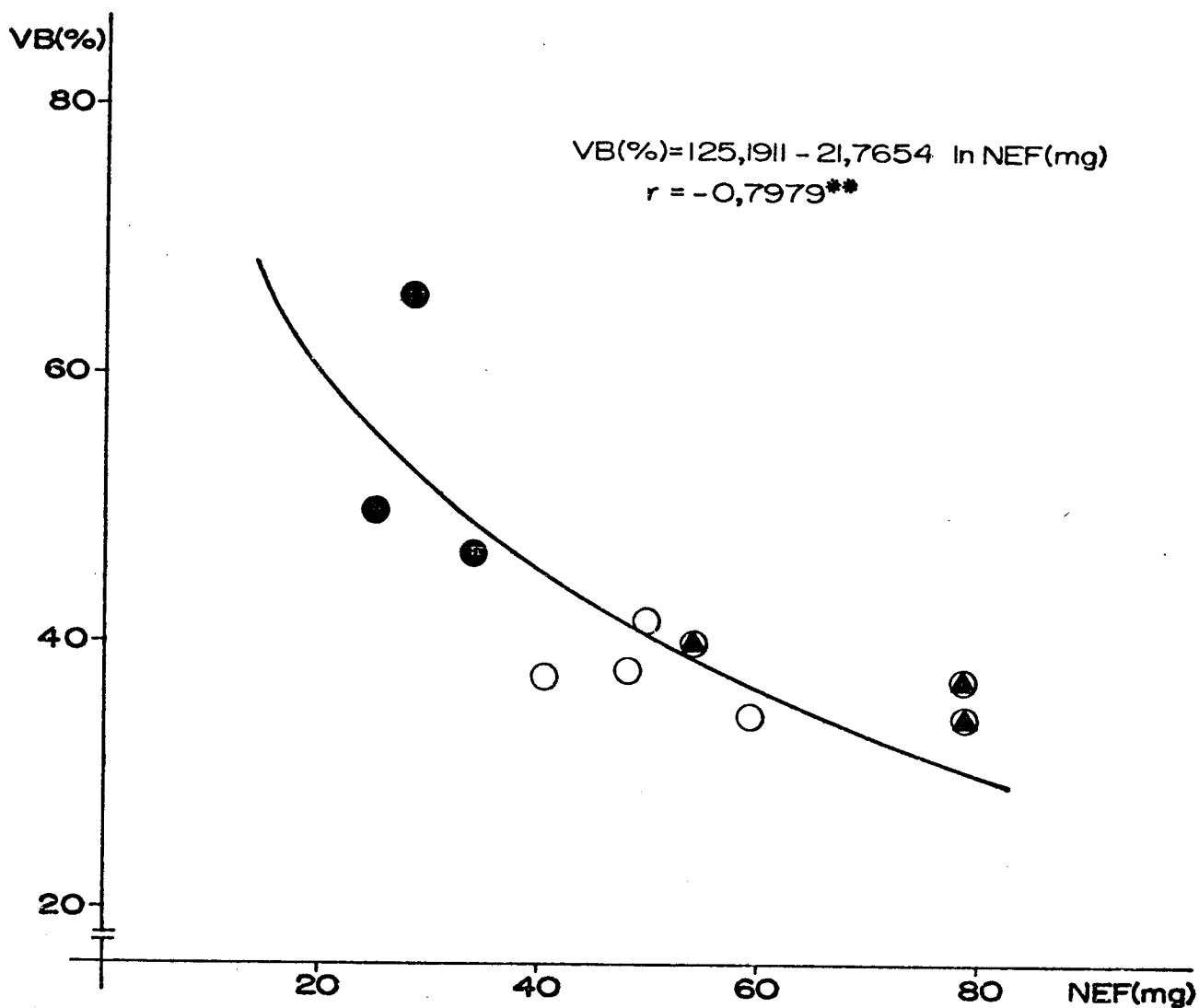


FIGURA 25. Regressão logarítmica para a relação entre o valor biológico aparente (VB) de proteína de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, integral cozido e como extrato protéico cru e autoclavado, e a quantidade (mg) de nitrogênio endógeno fecal (NEF) real de ratos Wistar, previamente jejuados e mantidos em balanço de nitrogênio de 4 dias; feijão integral cozido (○), extrato protéico cru (▲), extrato protéico autoclavado (●).

A diluição isotópica do nitrogênio 15 fecal, ao longo do balanço, está expressa em termos da variação diária da percentagem de ^{15}N do nitrogênio total das fezes dos ratos, nas dietas contendo feijão marcado, e mostrada na Figura 26. As linhas horizontais tracejadas indicam, de cima para baixo, o conteúdo de ^{15}N no feijão original (1,460%), nas dietas ($1,316 \pm 0,020\%$) e natural ($0,380 \pm 0,014\%$) e visam salientar as diluições isotópicas encontradas. As fezes dos ratos em dietas de feijão cru, apresentaram uma mesma percentagem de ^{15}N ao longo do experimento. Para o grupo na dieta preparada com extrato protéico autoclavado, a diluição isotópica foi bem maior em 24 horas e decresceu de forma marcante até 48 horas. Para os ratos nas dietas de feijão cozido e extrato protéico em natureza, as diluições isotópicas de ^{15}N das fezes foram intermediárias em 24 h e diminuíram pouco até 48 h. Estes resultados concordam com aqueles encontrados para o experimento de liberação acumulada de radioatividade fecal dos ratos injetados com Gly ^{14}C (Figura 22). A partir das 48 h, as percentagens de ^{15}N não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$), para os ratos em cada grupo dietário, indicando que o nitrogênio marcado havia atingido um "steady state". Pode ser ressaltado o fato de que, com exceção dos ratos em dietas de feijão cru, as variações das percentagens de nitrogênio total das fezes dos ratos, ao longo do balanço, foram semelhantes às encontradas para o nitrogênio 15, como pode ser observado na Figura 27. Também neste caso, não foram encontradas diferenças entre as percentagens de nitrogênio fecal a nível de 5% de probabilidade, para os ratos em cada dieta contendo feijão, com exceção daqueles em dieta de feijão cru, a partir das 48 horas de balanço. Esta observação de que as percentagens de nitrogênio total das fezes dos ratos em dietas de feijão cru, aumentaram ao longo do balanço, somada ao fato das diluições isotópicas

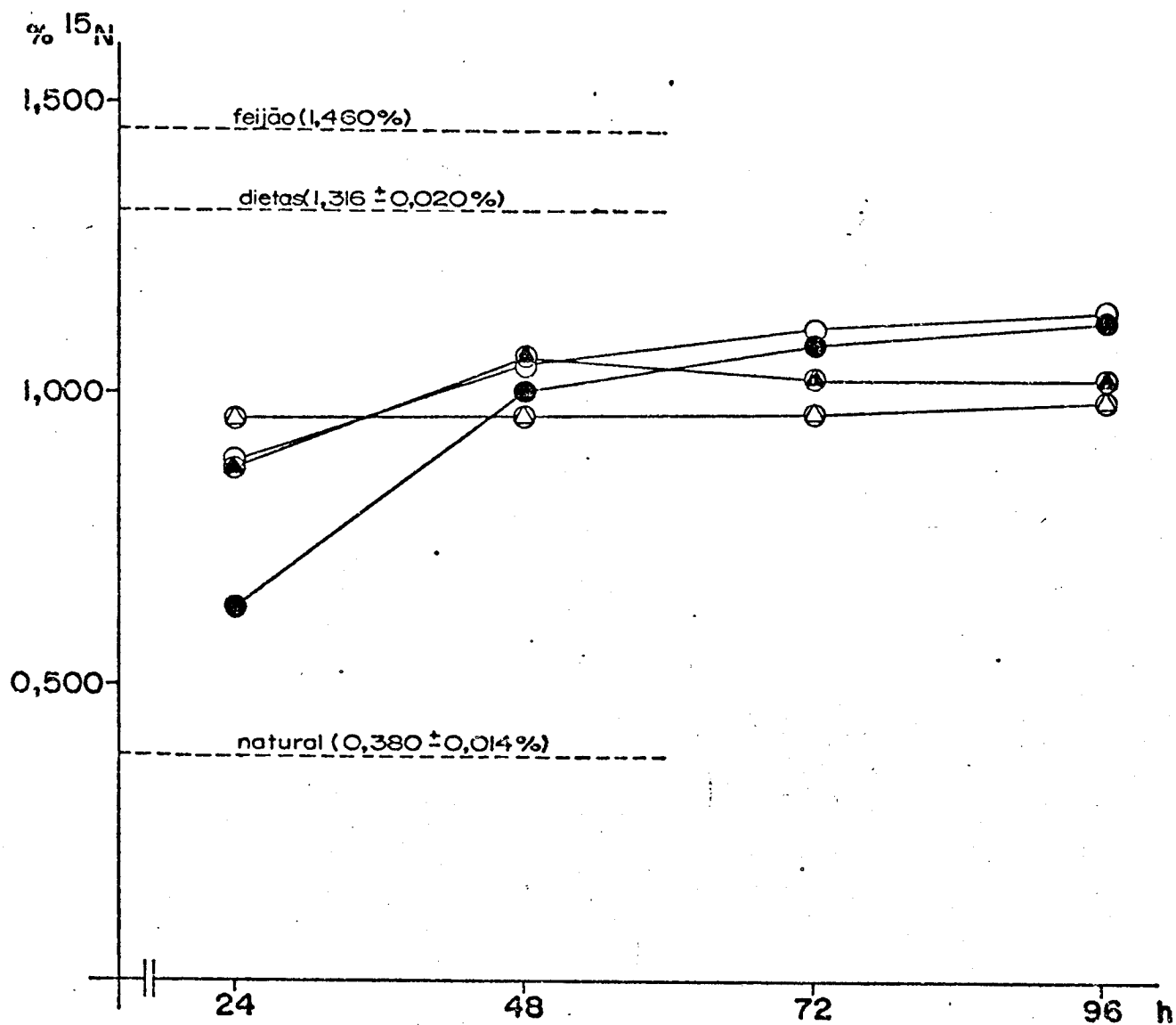


FIGURA 26. Variação das percentagens de nitrogênio 15 do nitrogênio total das fezes de ratos Wistar, adrede jejuados, ao longo de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dieta de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, integral e como extrato protéico, cru e cozido; as percentagens de ^{15}N do feijão original, das dietas e natural estão indicadas pelas retas tracejadas; △ - feijão cru, ○ - feijão cozido, △ - extrato protéico cru, ● - extrato protéico autoclavado.

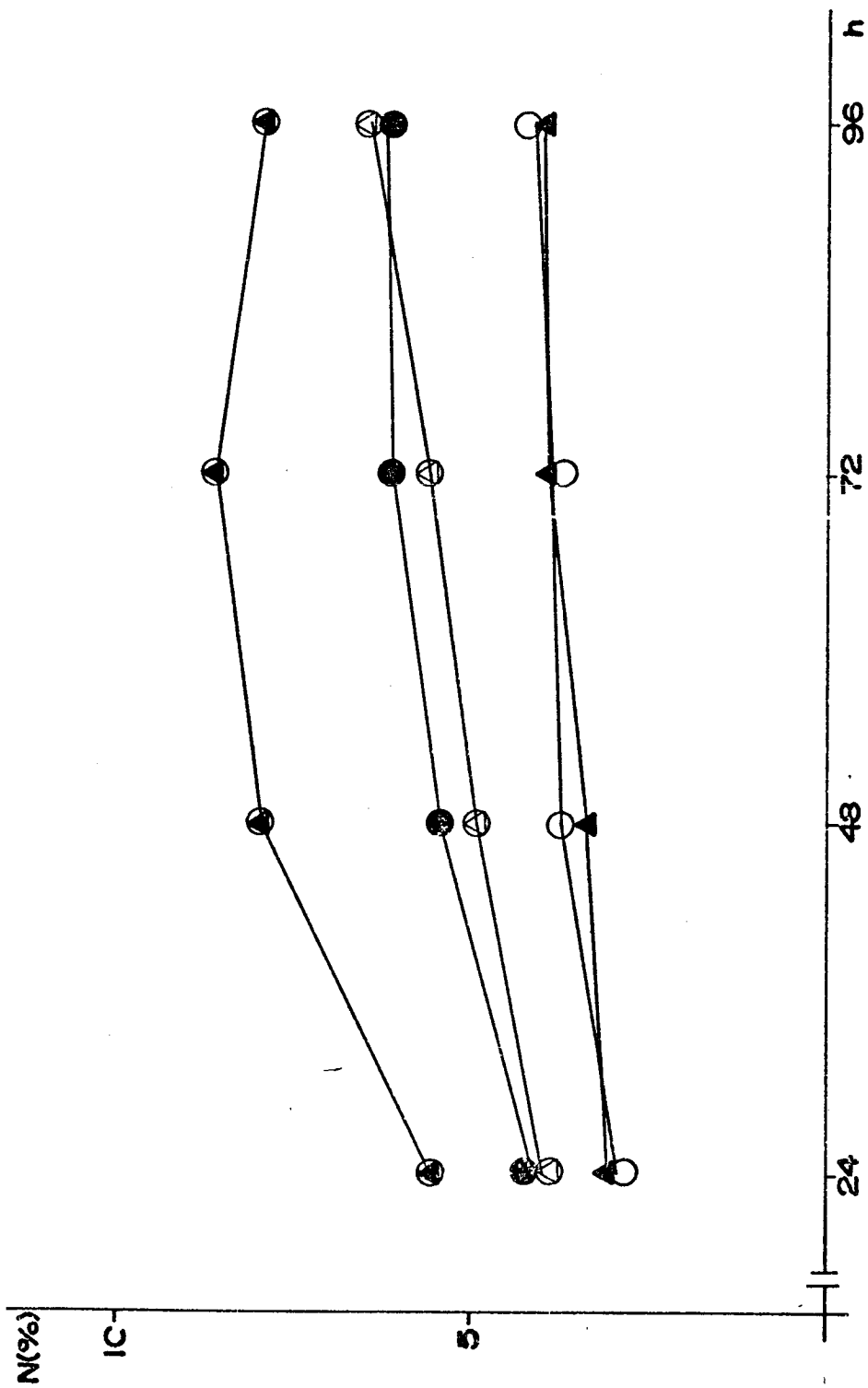


Figura 27. Variação das percentagens de nitrogênio fecal de ratos Wistar, adre de jejuados, durante balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas de caseína e feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*), integral e como extrato protéico, crus e tratados termicamente; ▲-caseína, ⊙-feijão cru, ○-feijão cozido, ●-extrato protéico cru, ●-extrato protéico autoclavado.

de ^{15}N (Figura 22) e da quantidade de fezes (a partir das 48 h) não terem variado, demonstrou que a excreção endógena fecal aumentou progressivamente.

A Tabela 15 mostra que os pesos das carcaças dos ratos nas dietas de feijão e extrato protéico tratados termicamente, ao final do balanço, foram maiores do que aqueles dos ratos nas dietas de feijão e extrato protéico crus. Já os pesos das vísceras, não apresentaram diferenças marcantes entre os ratos nas diversas dietas, sendo pouco superiores para os ratos nas dietas contendo extrato protéico. Os conteúdos gastrintestinais mostraram-se maiores para os ratos nas dietas de feijão e extrato protéico crus. No tocante às percentagens e quantidades de nitrogênio dos materiais analisados, encontrou-se pouca variação no caso das carcaças e vísceras, mas as quantidades de nitrogênio dos conteúdos gastrintestinais, foram também maiores para os ratos em dieta de feijão e extrato protéico crus. Os dados da Tabela 16 indicam a ocorrência de uma baixa incorporação do nitrogênio proveniente do feijão, nas carcaças e vísceras dos ratos em dietas de feijão e extrato protéico em natureza, ao final dos 4 dias de balanço, quando comparado com os ratos nas dietas contendo as mesmas fontes protéicas tratadas termicamente. Observou-se uma quantidade semelhante de nitrogênio oriundo do feijão presente no conteúdo gastrintestinal dos ratos para todas as dietas, o que demonstrou que as maiores quantidades de nitrogênio total nos tratos gastrintestinais dos ratos em dietas de feijão e extrato protéico crus (Tabela 15), eram devidas a uma maior quantidade de nitrogênio endógeno. Este fato ratifica os resultados encontrados para as quantidades de nitrogênio endógeno das fezes, mostrados na Tabela 14.

TABELA 15. Peso e nitrogênio total de carcaças, vísceras e conteúdos gastrintestinais de ratos¹ Wistar, ao final de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em canteiro experimental, como fonte protéica.

DIETA	CARCAÇA		VÍSCERAS		CONTEÚDO GASTRINTestinal	
	Peso(g)	N(%)	Peso(g)	N(%)	Peso(g)	N(%)
Feijão integral cozido	46,05	3,16	1,46	2,79	4,50	1,63
Feijão integral cru	39,51	3,35	1,32	2,73	6,29	1,73
Extrato protéico autoclavado	44,95	3,11	1,40	2,67	3,15	1,98
Extrato protéico cru	37,84	3,56	1,35	2,64	7,52	1,55

1. Os resultados representam a média para 2 ratos.

TABELA 16. Contribuição percentual¹ e quantidade de nitrogênio oriundo do feijão em carcaças, vísceras e conteúdos gastrintestinais de ratos² Wistar, ao final de balanço de nitrogênio de 4 dias, em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cultivado em can- teiro experimental, como fonte protéica.

DIETA	NITROGÊNIO ORIUNDO DO FEIJÃO					
	CARÇAÇA		VÍSCERAS		CONTEUDO GASTRINTESTINAL	
	%	g	%	g	%	g
Feijão integral cozido	14,40	0,21	27,85	0,07	57,25	0,04
Feijão integral cru	3,38	0,04	12,42	0,03	41,54	0,05
Extrato protéico autoclavado	15,02	0,21	28,57	0,08	59,61	0,04
Extrato protéico cru	2,75	0,04	12,06	0,04	42,18	0,05

1. Com relação ao nitrogênio total;
2. Os resultados representam a média para 2 ratos.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foram desenvolvidas as pesquisas, pôde-se concluir que:

- 5.1. O tratamento térmico do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.; cultivar Carioca 80), sob forma integral e de extrato protéico, ocasionou um aumento da digestibilidade das proteínas; este apresentou um valor absoluto médio de 23,6% para a digestibilidade *in vitro* e de 43,3% para a digestibilidade *in vivo*, aparente e verdadeira; por sua vez, a digestibilidade *in vivo* real, livre de interferências endógenas, apresentou aumento de 29,4%. Com relação ao valor biológico das proteínas do feijão, concluiu-se que, embora apresentasse aumento elevado dos valores aparentes e verdadeiros devido ao tratamento térmico, os valores reais mostraram uma pequena redução de 8,0%, em termos absolutos.

- 5.2. O isolamento da proteína da farinha integral do feijão, melhorou seu valor nutricional: a digestibilidade *in vitro* aumentou em média, 20,1%, a digestibilidade *in vivo*, aparente e verdadeira, 23,7% e a digestibilidade *in vivo* real, 14,2%; o valor biológico, aparente e verdadeiro, apresentou um aumento absoluto considerável, mas aqueles reais, somente de 10,2%. Inferiu-se que existem substâncias no feijão, de provável natureza não-protéica, capazes de interagirem com as suas proteínas ou com as enzimas proteolíticas, reduzindo a digestibilidade, além de interferirem ao nível de metabolismo intermediário.

5.3. Ratos em dietas contendo feijão cru ou cozido, como única fonte proteica, excretaram uma quantidade de nitrogênio endógeno fecal significativamente maior ($P < 0,05$), do que ratos em dietas de caseína e estes, mostraram uma excreção maior do que aqueles em dieta aprotéica; assim, a utilização de uma dieta aprotéica não é confiável para o cálculo da digestibilidade e valor biológico verdadeiros, para proteínas de *Phaseolus vulgaris* e caseína. As lectinas ativas existentes no feijão cru, pela sua ação de necrose de células absorptivas do intestino dos ratos, com ulceração e conseqüente exsudação e perda de proteínas plasmáticas, parecem constituir a principal causa de aumento do nitrogênio endógeno das fezes, nos ratos colocados em dietas contendo feijão cru como fonte proteica.

5.4. A digestibilidade e o valor biológico aparentes das proteínas do feijão, apresentaram correlação negativa significativa ($P < 0,01$), forte ($r = -0,9621$) e moderada ($r = -0,7979$), respectivamente, com a quantidade de nitrogênio endógeno fecal excretada pelo rato; por outro lado, os valores de digestibilidade e valor biológico reais, obtidos pelo balanço do excesso de nitrogênio 15 , foram superiores àqueles aparentes e verdadeiros, obtidos pelo balanço do nitrogênio total. Inferiu-se que a excreção fecal de nitrogênio endógeno, constitui um importante fator de redução indireta da digestibilidade e valor biológico aparentes das proteínas do feijão e que os métodos convencionais de cálculo subestimam estes resultados de qualidade proteica, especialmente no caso do feijão cru.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKESON, W.R. & STAHMANN, M.A. (1964). A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.* 83: 257-261.
- ANTUNES, P.L. (1979). Composição e propriedades nutricionais das proteínas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*, L.). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, p. 137.
- ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V.C. (1980). Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 28: 935-938.
- ARAYA, J.; ARAYA, H. & TAGLE, M.A. (1974). Excreción de nitrógeno fecal endógeno en la rata. *Arch. Latinoam. Nutr.* 4: 97-106.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1975). Official Methods of Analysis, 12th Edition. Ed. W. Horwitz, A.O.A.C., Washington D.C. p. 857.
- BALDI, G. & SALAMINI, F. (1973). Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species. *Theor. Appl. Genetics* 43: 75-78.
- BECKMAN INSTRUMENTS, INC. (1977). Beckman 118/119 BL, 118/119 CL Amino Acid Analysers. Instruction Manual. Spinco Division, Palo Alto. California.

- BENDER, A.E. & MOHAMMADIHA, H. (1981). Low digestibility of legume nitrogen. Proc. Nutr. Soc. 40: 66A.
- BENDER, A.E. & REAIDI, G.B. (1982). Toxicity of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) with particular reference to lectins. J. Plant Foods. 4: 15-22.
- BOSSHARDT, D.K. & BARNES, R.H. (1946). The determination of metabolic fecal nitrogen and protein digestibility. J. Nutr. 31: 13-21.
- BREMNER, J.M. (1965). Isotope ratio analysis of nitrogen in nitrogen 15 tracer investigations. In Methods of Soil Analysis, Eds. C. A. Black, D.D. Evans, L.E. Ensminger & F.E. Clark. Vol. 2, p. 1256-1286.
- BRUWAENE, R. VAN; KIRCHMANN, R.; CHARLES, P. & HOEK, J. VAN DEN (1976). Digestibility of cow's tritiated milk powder by calf and pig. In Nuclear Techniques in Animal Production and Health, Symposium IAEA/FAO, Vienna, p. 403-410.
- COMAR, C.L. (1955). Radioisotopes in Biology and Agriculture. Ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, p. 144, 223.
- COMAR, C.L.; MONROE, R.A.; VIZEK, W.I. & HANSARD, S.L. (1953). Comparison of two isotope methods for determination of endogenous fecal calcium. J. Nutr. 50: 459-467.

- DAWSON, R. & PORTER, J.W.G. (1962). An investigation into protein digestion with ^{14}C -labelled protein. 2. The transport of ^{14}C -labelled nitrogenous compounds in the rat and cat. *Brit. J. Nutr.* 16: 27-38.
- DE MUELENAERE, H.J.H. (1965). Toxicity and hemagglutinating activity of legumes. *Nature (London)* 206: 827-828.
- ELMSLIE, W.P. (1958). Report on digestibility of proteins. *J. A.O.A.C.* 41: 233-240.
- EVANS, R.J. & BAUER, D.H. (1978). Studies of the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 26: 779-784.
- FIELDS, R. (1972). The rapid determination of amino groups with TNBS. *In* *Methods in Enzymology*. Eds. S.P. Colowick & N.O. Kaplan, Academic Press, New York, 25B: 464-468.
- FIGUEIROA, M.O.R.; MANCINI FILHO, J. & LAJOLO, J.M. (1984). Ação anti-nutricional das fitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*, L. *Arch. Lationam. Nutr.* 34: 488-499.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (1971). *Food Balance Sheets, 1964-1966*. FAO, Rome, Italy.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (1977), *Estudo Nacional da Defesa Familiar. Dados Preliminares. Consumo Alimentar-Antropometria*. Fundação IBGE, Rio de Janeiro.

- GALEAZZI, M.A.M. (1981). Nutritional changes of soybean protein by different storage conditions: approach for evaluation in vitro. Report of United Nations University, National Food Research Institute, Japan.
- GALEMBECK, F.; RYAN, D.S.; WHITAKER, J.R. & FEENEY, R. E. (1977). Reaction of proteins with formaldehyde in the presence and in the absence of sodium borohydride. *J. Agric. Food Chem.* 25: 238-245.
- GALLO-TORRES, H.E. & LUDORF, J. (1973). Comparison of the portal absorption of protein and small peptides in the fed and fasted rats. *J. Nutr.* 103: 1745-1755.
- GAZO, M.L.; BODA, K.; SNEJDARKOVA, M.; JANKELA, J.; BAKO, I.; TKAC, M. & BARANOVSKA, M. (1976). Kinetics of absorption of perorally applied carbon-14 arginine in Japanese quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *In* Nuclear Techniques in Animal Production and Health, Symposium IAEA/FAO, Vienna, p. 385-391.
- GEST, H.; KAMEN, M.D. & REINER, J.M. (1947). The theory of isotope dilution. *Arch. Biochem. Biophys.* 12: 273-281.
- GRAY, W.R. & HARTLEY, B.S. (1963). A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides. *Biochem. J.* 89: 59 P.
- GREEN, G.M. & LYMAN, R.L. (1972). Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140: 6-12.

- GREENSTEIN, J.P. & WINITZ, M. (1961). Chemistry of the Amino Acids. Vol. 1. John Wiley & Sons, New York, p. 245-432.
- HEGSTED, M.D.; MILLS, R.C.; ELVEHJEM C.A. & HART, E.B. (1941). Choline in the nutrition of chicks. J. Biol. Chem. 138: 459-466.
- HENNIG, A.; GRUHN, K. & JAHREIS, G. (1976). Utilization of nitrogen 15 from wheat by growing poultry and laying hens. In Nuclear Techniques in Animal Production and Health, Symposium IAEA/FAO, Vienna, p. 373-380.
- HONAVAR, P.M.; CHENG-VEN, S. & LIENER, I.E. (1962). Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. J. Nutr. 77: 109-114.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. (1972). Tracer manual on crops and soils. Bulletin Series n° 172.
- JACOBS, F.A. (1965). Bidirectional flux of amino acids across the intestinal mucosa. Federation Proc. 24: 946-952.
- JAFFÉ, W.G. (1950). Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75: 219-220.
- JAFFÉ, W.G. (1969). Hemagglutinins. In Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Ed. Irvin E. Liener, Academic Press, New York, p. 69.

- JAFFÉ, W.G. & CAMEJO, G. (1961). La acción de una proteína tóxica, aislada de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*), sobre la absorción intestinal en ratas. Acta Cient. Venez. 12: 59-61.
- JAFFÉ, W.G. & BRÜCHER, O. (1972). Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr. 22: 267-281.
- JAFFÉ, W. & BRÜCHER, O. (1974). El contenido de nitrógeno total y aminoácidos-azufrados en diferentes líneas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr. 24: 107-113.
- JOHNS, C.O. & FINKS, A.J. (1920). Studies in nutrition. II. The role of cystine in nutrition as exemplified by nutrition experiments with the proteins of the navy bean, *Phaseolus vulgaris*. J. Biol. Chem. 41: 379-389.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. (1979). Histologia básica. 4^a Edição Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 24.
- JUNQUEIRA, R.G. & SGARBIERI, V.C. (1981). Isolation and general properties of lectins from the bean (*Phaseolus vulgaris*, L., var. Rosinha G2). J. Food Biochem. 5: 165-179.
- KABAT, E.A. & MAYER, M.M. (1971). Experimental Immunochemistry. 2nd Edition. 4th Printing. C.C. Thomas, Publisher. Springfield, Illinois USA, p. 116.
- KAKADE, M. L. (1974). Biochemical basis for the differences in plant protein utilization. J. Agric. Food Chem. 22: 550-555.

- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. (1966). Growth inhibition of rats fed raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Nutr. 90: 191-198.
- KAKADE, M.L.; SIMONS, N. & LIENER, I.E. (1969). An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chem. 46: 518-526.
- KAMER, J.H. VAN DE & GINKEL, L. VAN (1952). Rapid determination of crude fiber in cereals. Cereal Chem. 29: 239-251.
- KAPLAN, L. (1965). Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). Econ. Bot. 19: 358-368.
- KENNY, A.J. & BOOTH, A.G. (1978). Microvilli: Their Ultrastructure, Enzymology and Molecular Organization. In Essays in Biochemistry, Ed. P.N. Campbell & W. N. Aldridge, Academic Press, London, 14: 1-44.
- KING, T.P.; PUSZTAI, A. & CLARKE, E.M.W. (1980a). Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-induced lesions in rat small intestine: 1. Light microscope studies. J. Comp. Path. 90: 585-595.
- KING, T.P.; PUSZTAI, A. & CLARKE, E.M.W. (1980b). Immunocytochemical localization of ingested kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in rat gut. Histochem. J. 12: 201-208.
- KUNITZ, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol. 30: 291-310.

- LANTZ, E.M.; GOUGH, H.W. & CAMPBELL, A.M. (1958). Effect of variety, location and years on the protein and aminoacid contents of dry beans. *J. Agric. Food Chem.* 6: 58-60.
- LEE, H.S.; SEN, L.C.; CLIFFORD, A.J.; WHITAKER, J.R. & FEENEY, R. E. (1978). Effect of reductive alkylation of the ϵ -amino group of lysyl residues of casein on its nutritive value in rats. *J. Nutr.* 108: 687-697.
- LEVIN, J. (1978). *Estatística Aplicada a Ciências Humanas.* |Elementary Statistics in Social Research, 2th Ed. |. Ed. Harper & Row do Brasil Ltda., São Paulo, p. 211.
- LIENER, I.E. (1974). Phytohemagglutinins: their nutritional significance. *J. Agric. Food Chem.* 22: 17-22.
- LIENER, I. (1979). Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. *J. Am Oil Chemists' Soc.* 56: 121-129.
- LIENER, I.E. & THOMPSON, R.M. (1980). In vitro and in vivo studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). *Qual. Plant Plant Food Hum. Nutr.* 30: 13-25.
- LOFGREEN, G.P. & KLEIBER, M. (1953). The metabolic fecal nitrogen excretion of the young calf and the true digestibility of casein. *J. Nutr.* 49: 183-190.

- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARQUEZ, U.M.L. & LAJOLO, F.M. (1981). Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 29: 1068-1074.
- MEANS, G.E. & FEENEY, R.E. (1968). Reductive alkylation of amino groups in proteins. *Biochem.* 7: 2192-2201.
- MITCHELL, H.H. (1923-24). A method of determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.* 58: 873-903.
- MITCHELL, H.H. (1924). The biological value of protein at different levels of intake. *J. Biol. Chem.* 58: 905-922.
- MITCHELL, H.H. & CARMAN, G.G. (1926). The biological value of the nitrogen of mixtures of patent white flour and animal foods. *J. Biol. Chem.* 68: 183-215.
- MITCHELL, H.H. & BLOCK, R.J. (1946). Some relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive value for the rat. *J. Biol. Chem.* 163: 599-620.
- MIYOSHI, M.; NAKABAYASHI, J.; HARA, T.; YAWATA, T.; TSUKAMOTO, I. & HAMAGUCHI, Y. (1982). The lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 28: 255-264.

- MONTES, A.L. (1966). Bromatologia. Tomo I. Ed. Universitária de Buenos Aires, p. 10.
- NASSET, E.S. (1965). Role of the digestive system in protein metabolism. Federation Proc. 24: 953-958.
- NASSET, E.S. & JU, J.S. (1961). Mixture of endogenous and exogenous protein in the alimentary tract. J. Nutr. 74: 461-465.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, COMMITTEE ON DIETARY ALLOWANCES. (1980). Recommended Dietary Allowances. 9th Revised Edition. National Academy of Sciences, Washington, D.C., p. 39-54.
- NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION (1977/1978). INC Diet Catalog. NBC, Cleveland, Ohio, p. 18, 24.
- OCHOA-SOLANO, A. & GITLER, C. (1968). Digestion and absorption of ingested and secreted proteins labeled with ⁷⁵Se-selenomethionine and ³⁵S-methionine in the gastrointestinal tract of the rat. J. Nutr. 94: 249-255.
- OLIVEIRA, A.L. & SILVA, W.D. (1970). Imunologia - Alergia - Métodos. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 151, 613.
- OSBORNE, T.B. (1894). The proteids of the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) J. Amer. Chem. Soc. 16: 633-643, 703-712, 757-764.
- OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B. & FERRY, E.L. (1919). A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. J. Biol. Chem. 37: 223-243.

- OSNER, R.C. & JOHNSON, R.M. (1968). Nutritional changes in proteins during heat processing. *J. Food Technol.* 3: 81-86.
- PAPUS |GÉRARD ENCAUSSE| (1984). *Tratado de Ciências Ocultas - I |Traité Elémentaire de Science Occulte|*. Editora Três Ltda., São Paulo, Brasil, p. 44-45.
- PIKE, R.L. & BROWN, M.L. (1967). *Nutrition: An Integrated Approach*. Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York. p. 410.
- PION, R.; MENOLES-PEREIRA, E. & PRUGNAUD, I. (1979). Effect of composition and processing on the nutritive value of some leguminous seeds. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 56: 150-153.
- PITTMAN, M.S. (1932). The utilization by human subjects of the nitrogen, calcium and phosphorus of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*) with and without a supplement of cystine. *J. Nutr.* 5: 277-294.
- PURI, S.C. & MULLEN, K. (1980). *Applied Statistics for Food and Agricultural Scientists*. Ed. G.K. Hall Medical Publishers, Boston, Massachusetts, p. 160-161.
- PUSZTAI, A. & PALMER, R. (1977). Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the toxic principle. *J. Sci. Food Agric.* 28: 620-623.
- PUSZTAI, A.; GRANT, G. & PALMER, R. (1975). Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the isolation and partial characterisation of toxic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 26: 149-156.

- PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W.; KING, T.P. & STEWART, J.C. (1979a). Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 30: 843-848.
- PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W. & KING, T.P. (1979b). The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc. Nutr. Soc.* 38: 115-120.
- PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W.; GRANT, G. & KING, T.P. (1981). The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Food Agric.* 32: 1037-1046.
- ROGERS, Q.R. & HARPER, A.E. (1966). Protein Digestion: Nutritional and Metabolic Considerations. *In* World Review of Nutrition and Dietetics, Ed. G.H. Bourne, S. Karger/Basel, New York 6: 250-291.
- ROMERO, J. & RYAN, D.S. (1978). Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L., to in vitro enzymatic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 26: 784-788.
- SAWAZAKI, H.E.; OLIVEIRA, A.C. & GALEAZZI, M.A.M. (1983). Extração, caracterização e algumas propriedades nutricionais das proteínas de feijão Carioca-80 (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Ciência e Cultura* 35: 57. Resumos.
- SCHOENHEIMER, R.; RATNER, S. & RITTENBERG, D. (1939). Studies in protein metabolism. X. The metabolic activity of body proteins investigated with 1(-)-leucine containing two isotopes. *J. Biol. Chem.* 130: 703-732.

- SGARBIERI, V.C. (1979). Propriedades físico-químicas e nutricionais de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) variedade Rosinha G2. Tese de Livre Docência. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, p. 58.
- SGARBIERI, V.C. (1980). Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família Leguminosae. *Ciência e Cultura* 32: 78-84.
- SGARBIERI, V.C. & WHITAKER, J.R. (1981). Partial characterization of trypsin - chymotrypsin inhibitors from bean (*Phaseolus vulgaris*, L., var. Rosinha G-2): chemical and physical properties. *J. Food Biochem.* 5: 215-232.
- SGARBIERI, V.C. & WHITAKER, J.R. (1982). Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. In *Advances in Food Research*, Ed. C.O. Chichester; E.M. Mrak & B. S. Shweigert, Academic Press, New York, 28: 93-166.
- SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L. & ALMEIDA, L.D. (1979). Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Food Sci.* 44: 1306-1308.
- SGARBIERI, V.C.; CLARKE, E.M.W. & PUSZTAI, A. (1982a). Proteolytic breakdown of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) storage proteins: nutritional implications. *J. Sci. Food Agric.* 33: 881-891.

- SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L. & JUNQUEIRA, R.G. (1982b). Algumas propriedades físico-químicas e nutricionais de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.; var. Rosinha G2). Ciênc. Tecnol. Alim. 2: 1-20.
- SGARBIERI, V.C.; TEZOTO, S. & OLIVEIRA, A.C. (1983). Estudo da composição e do valor nutritivo de uma nova cultivar de feijão. VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Brasília, p. 85-86. Resumos.
- SIMPSON, D.L.; THORNE, D.R. & LOH, H.H. (1978). Lectins: endogenous carbohydrate-binding proteins from vertebrate tissues: functional role in recognition processes? In Life Sciences, Pergamon Press, USA, 22: 727-748.
- SMITH, R.C. (1972). Acetylation of methionine sulfoxide and methionine sulfone by the rat. Biochem. Biophys. Acta 261: 304-309.
- SNEDECOR, G.W. (1948). Métodos de Estadística (Statistical Methods, 4th Ed.). Ed. Acme Agency Soc. Resp. Ltda., Buenos Aires, p.179.
- SNOOK, J.T. & MEYER, J.H. (1964). Response of digestive enzymes to dietary protein. J. Nutr. 82: 409-414.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Anal Chem. 30: 1190-1197.

- TOBIN, G. & CARPENTER, K.J. (1978). The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): a literature review. Nutrition Abstracts and Reviews - Series A. Human and Experimental 48: 919-936.
- VAN SLYKE, D.D. & MEYER, G.M. (1913). The fate of protein digestion products in the body. III. The absorption of amino-acids from the blood by the tissues. J. Biol. Chem. 16: 197-212.
- WANG, C.H. & WILLIS, D.L. (1965). Radiotracer Methodology in Biological Science. Eds. W.D. McElroy & C.P. Swanson, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. p. 8.
- WATERMAN, H.C. & JOHNS, C.O. (1921). Studies on the digestibility of proteins in vitro. I. The effect of cooking on the digestibility of phaseolin. J. Biol. Chem. 46: 9-17.
- WEICHSELBAUM, T.E. (1946). An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Amer. J. Clin. Path. Tech. Suppl. 10:40-49.
- WHITAKER, J.R. & SGARBIERI, V.C. (1981). Purification and composition of the trypsin - chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha G2. J. Food Biochem. 5: 197-213.
- WILLIAMS, P.C. (1973). The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. J. Sci. Food Agric. 24: 343-348.

WOLZAK, A.; BRESSANI, R. & BRENES, R.G. (1981). A comparison of in vivo and in vitro estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr. 31: 31-43.

WOMACK, M.; KEMMERER, K.S. & ROSE, W.C. (1937). The relation of cystine and methionine to growth. J. Biol. Chem. 121: 403-410.

YAMAGUCHI, M.; HWANG, H.G.; KAWAGUCHI, K. & KANDATSU, M. (1973). Metabolism of ^{15}N - labelled Chlorella protein in growing rats with special regard to the nutritive value. Br. J. Nutr. 30: 411-424.

APÊNDICE 1

As percentagens e quantidades de nitrogênio endógeno das fezes (NEF) e urinas (NEU) excretadas pelos ratos, foram determinadas, por meios do "quadrado de Pearson" ou "regra de mistura", através das diluições isotópicas. Supondo um dos quatro ratos em dieta contendo feijão cozido, utilizado no Ensaio C, teríamos:

$$\% \text{ }^{15}\text{N dieta} = 1,317, \text{ lembrando que a } \% \text{ }^{15}\text{N} \text{ refere-se ao}$$

$$\text{N total}$$

$$\% \text{ }^{15}\text{N fezes} = 1,036$$

$$\% \text{ }^{15}\text{N natural (rato)} = 0,380$$

Compondo-se o quadrado de Pearson:

$$\begin{array}{rcc} 1,317 & & 0,656 \\ & \diagdown & / \\ & 1,036 & \\ & / & \diagdown \\ 0,380 & & 0,281 \end{array} \quad \text{Assim, } \begin{array}{r} 0,937 \\ 100 \end{array} - \begin{array}{r} 0,281 \\ x \end{array}$$

$$x = 29,99\% \text{ de NEF}$$

Para as determinações de NEU, era utilizado o mesmo sistema.

Os cálculos para determinação das digestibilidades e valores biológicos reais, tanto pelo balanço de excesso de ^{15}N , como pela correção dos valores aparentes pelos nitrogênios endógenos reais excretados, constituem uma identidade matemática.

A equação para o cálculo da digestibilidade real, através do balanço do excesso de ^{15}N , seria:

$$\text{DIG} = \frac{\text{mgN dieta}(\% \text{ }^{15}\text{N dieta} - \% \text{ }^{15}\text{N natural}) - \text{mgN fezes}(\% \text{ }^{15}\text{N fezes} - \% \text{ }^{15}\text{N natural})}{\text{mgN dieta}(\% \text{ }^{15}\text{N dieta} - \% \text{ }^{15}\text{N natural})} \quad (\text{Equação 1})$$

A equação para o cálculo da digestibilidade real, através da correção pelo nitrogênio endógeno fecal real, seria:

$$\text{DIG} = \frac{\text{mgN dieta} - \text{mgN fezes} + \text{mgN fezes} \left(\frac{\% \text{ }^{15}\text{N dieta} - \% \text{ }^{15}\text{N fezes}}{\% \text{ }^{15}\text{N dieta} - \% \text{ }^{15}\text{N natural}} \right)}{\text{mgN dieta}} \quad (\text{Equação 2})$$

O que se pretende demonstrar é que

$$\text{Equação 1} \equiv \text{Equação 2.}$$

Para efeito de simplificar os termos das equações, considerar-se-ã:

$$a = \text{mg N dieta}$$

$$b = \text{mg N fezes}$$

$$c = \% \text{ }^{15}\text{N dieta}$$

$$d = \% \text{ }^{15}\text{N fezes}$$

$$e = \% \text{ }^{15}\text{N natural}$$

Assim, ficaria:

$$\frac{a(c-e) - b(d-e)}{a(c-e)} \equiv \frac{a - b + b\left(\frac{c-d}{c-e}\right)}{a} \quad (\text{Equação 2})$$

(Equação 1)

multiplicando-se numerador e denominador por
c-e,

$$\equiv \frac{a(c-e) - b(c-e) + b(c-d)}{a(c-e)}$$

$$\equiv \frac{a(c-e) - b.c + b.e + b.c - b.d}{a(c-e)}$$

$$\equiv \frac{a(c-e) + b.c - b.d}{a(c-e)}$$

$$\equiv \frac{a(c-e) - b(d-e)}{a(c-e)}$$

c.q.d.

Para o valor biológico, a demonstração seria semelhante.

APÊNDICE 2

Para se estabelecer a correlação mais adequada entre duas variáveis, decidiu-se pelo ajustamento das seguintes regressões: linear, exponencial, logarítmica e potencial, tendo-se aceito aquela que apresentasse o maior valor absoluto de r (coeficiente de correlação linear de Pearson), significativo a 1% ou 5%.

Supondo-se, por exemplo, a determinação da relação entre a digestibilidade aparente das dietas contendo feijão como fonte protéica, DIG (%), e a percentagem de nitrogênio endógeno fecal, NEF (%), nas fezes dos ratos, teríamos os seguintes valores para os parâmetros encontrados pelo método dos mínimos quadrados:

TIPO DE REGRESSÃO	Parâmetros		
	a	b	r
Linear			
DIG = a + b.NEF	171,4174	-3,7982	-0,6578
Exponencial			
DIG = a.e ^{b.NEF}	3707,7379	-0,1451	-0,7525
Logarítmica			
DIG = a + b.ln NEF	437,6875	-112,2222	-0,6234
Potencial			
DIG = a.NEF ^b	83606037,17	-4,2434	-0,7060

Assim, optou-se pela regressão exponencial e o teste de r permitiu aceitar esta regressão pois para $n=14$, $GL=n-2=12$, o valor de r - tabela a nível de 1% é igual a 0,661.

A equação ficaria $DIG(\%)=3707,7379 \cdot e^{-0,1451 \text{ NEF}(\%)}$, $r=-0,7525$, $P<0,01$.

Ato contínuo, determinavam-se pontos através da equação e traçava-se a curva. Ver páginas 101 e 103.

Procedeu-se de forma idêntica para os outros conjuntos de pontos experimentais.