

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FRACIONAMENTO DO FEIJÃO CARIOCA 80
E INTERFERÊNCIA DAS FRAÇÕES NA UTILIZAÇÃO
PELO RATO DA PROTEÍNA DA DIETA

X
Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela

X
Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri
Orientador

38/89

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



BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri

Profa. Dra. Débora de Queiróz Tavares

Prof. Dr. Félix G. Reyes

Prof. Dr. Admar C. de Oliveira

Campinas, de

1989

A CONCHITA E ANA PAULA

Aos meus pais e irmãos
com amor e gratidão

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.....

Ao Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A. C. (CIAD A. C.) pelo afastamento concedido para a realização do curso.

À Secretaria de Educación Pública do México pela concessão de bolsa durante dois anos.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, pela acolhida e oportunidade concedida para a realização do curso.

Ao professor Valdemiro C. Sgarbieri, pela orientação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante dois anos. .

Ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC), na pessoa do Dr. Eduardo Bulisani, pelo fornecimento do feijão.

À Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), pela gentileza das cópias deste trabalho.

Aos amigos Sin-Huei Wang, José Luis Ascherri, Sérgio Martínez Delgadillo, Miriam, Javier Telis, Vânia, Daniel Barrera, Neuza, Alfredo C. Orea, J. Luis Rigo Tovar, Gisela, José L.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica Nutricional, dona Esmeralda, Cristina, Lianinha e a todos aqueles que contribuíram de algum modo, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e ofereceram-me suas amizades.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE QUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. FEIJÃO	3
2.1.1. Origem histórica do feijão	3
2.1.2. Produção e consumo	3
2.1.3. Características agronômicas e origem do cultivar Carioca 80	5
2.2. COMPOSIÇÃO EM NUTRIENTES	6
2.2.1. Composição centesimal aproximada	6
2.2.2. Vitaminas e minerais	8
2.3. PROTEÍNAS DO FEIJÃO	9
2.3.1. Generalidades e nomenclatura das proteínas do feijão	9
2.3.2. Composição e algumas propriedades das proteínas do feijão	11
2.4. ALGUNS FATORES TÓXICOS E/OU ANTINUTRICIONAIS	17
2.4.1. Lectinas	17

2.4.2. Inibidores de enzimas digestivas	25
2.4.3. Taninos	27
2.4.4. Resistência à hidrólise enzimática das proteínas do feijão	32
2.4.5. Outros compostos antinutricionais de natureza não protéica	33
III. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. MATERIAIS	35
3.1.1. Feijão utilizado	35
3.1.2. Reagentes usados nas determinações químicas e bioquímicas	35
3.1.3. Material e animais utilizados nos ensaios. biológicos	36
3.1.4. Vidraria e aparelhos utilizados	36
3.2. MÉTODOS	38
3.2.1. Fracionamento do feijão Carioca 80	38
3.2.2. Determinações químicas	39
3.2.2.1. Umidade	39
3.2.2.2. Extrato etéreo	39
3.2.2.3. Cinza	39
3.2.2.4. Fibra crua	41
3.2.2.5. Carboidrato total	41
3.2.2.6. Proteína bruta	41

3.2.2.7. Ácidos graxos	42
3.2.2.8. Aminoácidos totais	42
3.2.2.9. Triptofano	43
3.2.2.10. Aminoácidos livres	44
3.2.2.11. Taninos	45
3.2.3. Determinações bioquímicas	45
3.2.3.1. Atividade do inibidor de tripsina	45
3.2.3.2. Digestibilidade da proteína <i>in vitro</i>	46
3.2.3.3. Atividade hemaglutinante	46
3.2.4. Ensaio biológicos com ratos	47
3.2.4.1. Procedimento na formação dos grupos de ratos	47
3.2.4.2. Descrição dos ensaios biológicos rea- lizados	49
3.2.4.3. Preparo das dietas	50
3.2.4.4. Cálculo do quociente de eficiência da dieta	53
3.2.4.5. Cálculo da digestibilidade	53
3.2.4.6. Cálculo do valor biológico	57
3.2.4.7. Cálculo da utilização líquida da proteína	57
3.2.5. Análise estatística	57

IV. RESULTADOS	58
4.1. Determinações químicas	58
4.1.1. Composição centesimal do feijão utilizado	58
4.1.2. Composição em ácidos graxos livres	58
4.1.3. Composição em aminoácidos totais	59
4.1.4. Contribuição de globulinas e albuminas para a proteína total	64
4.1.5. Composição em aminoácidos livres	62
4.1.6. Teor de taninos	64
4.2. Determinações bioquímicas	
4.2.1. Atividade do inibidor de tripsina	66
4.2.2. Atividade hemaglutinante	66
4.2.3. Digestibilidade da proteína in vitro	66
4.3. Balanços de nitrogênio em ratos	69
4.3.1. Balanço de nitrogênio utilizando 20% de caseína, mais 3% de cada fração	69
4.3.2. Balanço de nitrogênio utilizando 10% de caseína, mais 5% de cada fração	69
4.3.3. Balanço de nitrogênio utilizando 10% de caseína, mais 8% de cada fração suplementada com o 1º e 2º aminoácido limitante	72

4.3.4.	Balanço de nitrogênio utilizando 10% de caseína, mais 8% de cada fração autoclavada e suplementada com o 1º e 2º aminoácido limitante	74
V.	DISCUSSÃO	78
VI.	CONCLUSÕES	86
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

Quadros	Página
1. Composição centesimal aproximada de feijões brasileiros	7
2. Carboidrato total, proteína e conteúdo de aminoácidos no feijão integral, isolado protéico e nas frações albumina e globulina do feijão Rosinha G2	12
3. Comparação em aminoácidos essenciais de algumas variedades de feijão, com o padrão FAO/WHO (mg/gN)	15
4. Procedimento na formação dos grupos de ratos	48
5. Composição da mistura salina usada nas dietas	51
6. Composição da mistura vitamínica usada nas dietas	52
7. Composição da dieta do ensaio I	54
8. Composição da dieta do ensaio II	55
9. Composição da dieta do ensaio III e IV	56
10. Composição em ácidos graxos livres do óleo de feijão Carioca 80	59

11.	Composição em aminoácidos do material usado nas dietas	60
12.	Composição em aminoácidos livres nas várias frações obtidas do feijão C-80	63
13.	Caraterização parcial, química e bioquímica de diferentes frações de C-80	66
14.	Conteúdo de alguns fatores antinutricionais em dietas com 10% de proteína provida por caseína e várias frações (FR0-FR5) Comparações feitas com uma dieta com 10% de proteína, na qual, feijão cru (C-80) é usado como única fonte protéica.	68
15.	Resultados do ensaio I de balanço de nitrogênio usando 20% de proteína de caseína, mais 3% de cada fração	70
16.	Resultados do ensaio II de balanço de nitrogênio usando 10% de proteína de caseína, mais 5% de cada fração	71
17	Resultados do ensaio III de balanço de nitrogênio usando 10% de proteína proveniente de caseína, mais 8% de cada fração. Suplementada com o 1º e 2º aminoácido limitante	73

18	Escore químico de dietas contendo caseína e diferentes frações de feijão C-80	75
19	Resultados do ensaio IV de balanço de nitrogênio usando 10% de proteína proveniente de caseína, mais 8% de cada fração. Autoclavada e suplementada com o 1º e 2º aminoácido limitante	76

Figuras		Página
1.	Fracionamento dos grãos de feijão C-80 para a obtenção das frações FR0-FR5	40
2.	Balanço de materiais na extração do C-80	65

RESUMO

O feijão é uma boa fonte de proteínas vegetais, porém, qualitativamente as proteínas do feijão são inferiores às de muitas outras proteínas por conterem: inibidores de enzimas proteolíticas, lectinas, quantidades limitantes de aminoácidos sulfurados, baixa disponibilidade biológica de aminoácidos e baixa digestibilidade. A importância das substâncias de ação antinutricional presentes no feijão ainda não foi esclarecida por causa da ação simultânea dos vários fatores, alguns dos quais não identificados. Neste trabalho o feijão Carioca 80, após remoção do (casca) tegumento foi fracionado por extrações sucessivas com água e solução salina, com o objetivo de se estudar a distribuição e, tanto quanto possível, a natureza dos componentes antinutricionais dos grãos através da interferência das várias frações no quociente de eficiência da dieta (QED) e na utilização da proteína por ratos da linhagem Wistar, em crescimento. Foram feitas determinações da composição centesimal do feijão integral, aminoácidos totais e livres, taninos, atividade hemaglutinante, atividade do inibidor de tripsina e digestibilidade da proteína *in vitro* para cada uma das frações. A interferência das frações isoladas, na digestão e na utilização biológica das proteínas da dieta pelo rato, foi determinada usando-se dietas de caseína em combinação com cada uma das frações em diferentes proporções. Em um 1º ensaio contendo 3% das frações isoladas e 20% de proteína caseína, o efeito das frações sobre a utilização protéica e o QED foi mascarado pelo elevado teor de caseína. Mesmo assim, a dieta que continha uma das frações globulínicas foi a menos consumida e a digestibilidade aparente (DA) foi menor na fração com albuminas. As dietas com as frações casca e o resíduo final insolúvel apresentaram as menores diferenças com relação à dieta padrão. Em ensaios posteriores o nível de proteína foi reduzido para 10% e as frações de feijão elevadas para 5 e 8% (p/p). Ao nível de 5% as frações casca e o resíduo final insolúvel não afetaram significativamente o QED nem a utilização protéica. As frações albumina e globulina causaram um decréscimo significativo no QED e na absorção e utilização protéica; uma das frações globulina

apresentou os menores índices a despeito do fato da fração albumina ter apresentado a maior concentração de fatores antinutricionais. A fração casca continha 2,93% de taninos e quando adicionada à dieta com 10% de proteína, na proporção de 8% produziu uma diminuição no ganho de peso e no QED de 40,3 e 44,2%, respectivamente. Mesmo quando autoclavada o ganho de peso foi 38,7% e o QED 42,3%, inferior ao da caseína. A fração que continha sólidos solúveis da água de maceração e da água de diálise era relativamente alta em fenólicos e atividade hemaglutinante. A presença na dieta de 8% desta fração reduziu a ingestão em 42%, e o ganho de peso em 78,2%. O QED e o valor biológico (VBA), e a utilização líquida da proteína (NPUA) diminuíram significativamente. A autoclavagem destas frações diminuiu as diferenças com a dieta controle, porém não as eliminou. As frações protéicas, tanto albuminas quanto globulinas quando entraram na composição da dieta na proporção de 8% mesmo com a adição dos aminoácidos limitantes ao nível da caseína, interferiram pronunciadamente com a ingestão da dieta, crescimento dos ratos e com o QED. Os índices de utilização da proteína também foram insatisfatórios quando comparados aos da dieta com caseína. A autoclavagem destas frações eliminou o problema de consumo porém o ganho de peso e o QED continuaram baixos. A dieta com resíduo insolúvel não teve diferença significativa com o controle enquanto a consumo de dieta e a índices medidos.

Os dados obtidos neste trabalho, em confronto com os da literatura permitiram as seguintes conclusões: (A) que as maiores concentrações de substâncias antinutricionais localizam-se nas frações protéicas, albuminas e globulinas. (B) que o efeito antinutritivo das várias frações estudadas é devido à presença de compostos termolábeis e também termoestáveis que interferem com a ingestão de alimentos e com a utilização eficiente da proteína e da dieta como um todo. (C) O tratamento térmico não elimina o efeito antinutricional das frações de feijão por não eliminar os fatores antinutricionais termoestáveis e por causar interações que diminuem a biodisponibilidade de aminoácidos e de outros nutrientes essenciais.

SUMMARY

Nutritive value of beans is limited by various factors, such as: natural occurrence of lectins, inhibitors of digestive enzymes, tannins, phytic acid, saponins, flatulence producing oligosaccharides, low sulfur-containing amino acids, low bioavailability of essential amino acids, and low protein digestibility. Some of these factors are heat labile while others are heat stable. The chemical nature and the mode of action of these antinutritive compounds have not been thoroughly studied in beans.

In this work, beans of the cultivar Carioca 80 were fractionated into tegument (FR0), soluble solids in the maceration and dialysis water (FR1), protein fractions globulins, albumins, globulins (FR2, FR3, FR5) and remaining insoluble solids after extraction of the cotyledons with water and then with sodium chloride solution (FR4). The proximate percent composition, the tannin content and the activity of trypsin-chymotrypsin and the lectin (hemagglutination) were determined in the whole beans and in all fractions. Tannin content was higher (2,93% in FR0 than in the whole bean (0,65%). FR1 was also higher (0,8% in tannin and equaled the whole bean hemagglutination (128×10^2 HU/g sample); FR2 and FR5 were higher in hemagglutination but slightly lower in trypsin inhibitor than whole beans; FR3 (water soluble proteins) had trypsin inhibitory activity and hemagglutination much higher than whole beans; FR4 presented low antinutritive factors.

These fractions were introduced in rat diets at three different levels (3,5 and 8%). The 8% level was tested under two different conditions: unheated and supplemented with the two most limiting amino acids (methionine and tryptophan); heated and supplemented with the two limiting amino acids to the level of the casein diet (control). For the first biological assay diets were prepared with 20% casein and 3% of each fraction, on the top of the diet already

prepared. Consumption and protein digestibility decreased for the diets containing the protein fractions. For subsequent assays dietary protein was lowered to 10% and the concentration of bean fraction raised either to 5% or 8%. In all diets dietary protein was maintained at 10%, at expenses of casein. With 5% addition of each fraction, all fractions (except FR0 and FR4) decreased food intake, diet efficiency ratio and protein utilization. The most pronounced effect was measured in the diet containing FR5 followed by FR2 and FR3, in spite of the higher antitrypsin and hemagglutination activity in FR3. The undesirable effects were increased by addition of 8% of each fraction, even after supplementation of the fractions with methionine and tryptophan, to the level of the casein (control) diet. At this level all fractions (except FR0 and FR4) interfered drastically with diet efficiency ratio and protein utilization. FR4 did not interfere significantly with food intake and protein utilization (VBA and NPUA) but decreased significantly diet efficiency ratio, and interfered slightly with protein digestibility and growth. FR4 decreased growth and diet efficiency ratio but did not interfere with protein digestibility and utilization.

Data from this work permitted the following conclusions: (a) larger concentrations of antinutritional factors are found in the protein fractions, albumins and globulins. (b) the antinutritive effect of the various fractions can be attributed to the presence of heat labile and heat stable substances which interfere with food intake, growth, and protein digestibility and utilization. (c) heat treatment did not eliminate completely the antinutritive effect of the bean fractions by virtue of the presence of heat resistant antinutritive factors and by causing interactions which decrease bioavailability of amino acids and other essential nutrients.

I. INTRODUÇÃO

A deficiência protéico-calórica é um dos principais problemas nutricionais encontrados em países subdesenvolvidos. Embora os produtos de origem animal constituam a melhor fonte de proteína de boa qualidade, o seu alto custo, e a sua limitada disponibilidade reduzem seu consumo principalmente pelas classes menos favorecidas; neste caso adquire ainda maior importância a proteína de origem vegetal.

Os grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) são uma boa fonte de proteínas vegetais, contendo entre 18-35 % de proteína em base seca. Muitas classes de feijões têm sido usadas para alimentação desde tempos pre-históricos. Em países latino-americanos principalmente na Nicarágua, Brasil e México, o feijão tem mantido posição de destaque na dieta humana. Na atualidade são necessárias mais pesquisas em alimentos que já são tradicionais em nossos países, mais ainda quando se sabe que, qualitativamente, as proteínas do feijão são inferiores às de muitas outras proteínas por conterem: inibidores de enzimas proteolíticas, toxinas tais como lectinas, quantidades limitantes de aminoácidos sulfurados, baixa digestibilidade, baixa disponibilidade biológica de aminoácidos. Além disso, associado com o consumo de feijão, existe, para algumas pessoas, o desconforto fisiológico e social da

flatulência devido à presença de oligossacarídeos tais como verbascose, estaquiose e rafinose os quais, escapam à digestão devido à fraca atividade de α 1,6-galactosidase na mucosa intestinal. Conseqüentemente eles não são absorvidos e são metabolizados pela microflora do trato intestinal, resultando na produção de H_2 , CO_2 e em algumas pessoas CH_4 . O significado nutricional de cada uma destas substâncias antinutricionais não é muito claro, por causa da ação simultânea dos vários fatores, alguns dos quais não identificados.

O fracionamento do feijão Carioca 80 foi feito com o objetivo de se estudar a distribuição e, tanto quanto possível, a natureza dos componentes tóxicos dos grãos através da interferência das várias frações no quociente de eficiência das dietas e na utilização da proteína por ratos da linhagem Wistar, em crescimento.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feijão

2.1.1. Origem histórica do feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma planta da família leguminosa. Segundo AYKROYD E DOUGHTY, 1964, a família das leguminosas inclui, aproximadamente, 600 gêneros contendo cerca de 13.000 espécies. Contudo, menos de 20 espécies apresentam importância econômica, entre elas o feijão consumido no Brasil.

O centro de origem ou de irradiação primária do feijoeiro é o México e a América Central, mais precisamente os altiplanos do México, Guatemala, Honduras e Costa Rica. Pesquisas arqueológicas, entre as quais, determinações de carbono radioativo em vagens e sementes encontrados em túmulos astecas e incáicos, mostraram que a domesticação de várias espécies deste gênero foi feita pelos ameríndios há pelo menos 7.000 anos (KAPLAN, 1965).

2.1.2. Produção e consumo

A produção mundial de feijão gira em torno de 14,5 milhões de toneladas métricas (M.T.M.) sendo que desta produção

quase 8 milhões são produzidas na Ásia onde podem ser encontradas todas as espécies de *Phaseolus*, sobressaindo-se neste continente a Índia tanto na produção quanto no consumo. A produção na América do Norte e Central é de 2,8 (M.T.M.) sendo que os principais produtores são o México e os Estados Unidos da América do Norte. Considerando a América do Sul, nos últimos anos tem havido um decréscimo na produção de feijão que em 1982 foi de 3,58 (M.T.M.), das quais o Brasil contribuiu com 2,95 milhões, enquanto que em 1987 a produção foi de 2,7 milhões de toneladas tendo o Brasil contribuído com 2,1 milhões de toneladas. A diminuição foi devida, em grande parte, à substituição por outros cultivos como a soja que alcança melhores preços no mercado nacional e internacional, desincentivo do governo a esta cultura, exigências especiais de microclima para o feijoeiro, entre outros fatores. A produção de feijão na América Latina passou de 5,05 em 1982 para 4,3 (M.T.M.) em 1987 devido, em grande parte, à queda de produção brasileira (FAO 1983/87).

O consumo de feijão no Brasil tem diminuído de aproximadamente 70 g para 50 g/capita/dia, mesmo assim o Brasil junto com a Nicarágua e o México é um dos maiores consumidores de feijão da América Latina (BULISANI, DE ALMEIDA E ROSTON, 1987).

2.1.3. Características agronômicas e origem do cultivar Carioca 80

Novos cultivares de *Phaseolus vulgaris* estão continuamente sendo desenvolvidas e lançadas. O valor econômico de um novo cultivar depende de sua resistência a doenças, produtividade, tempo de maturação, tamanho do grão, qualidade nutricional e textura após cozimento. No entanto a contribuição nutricional, tem sido considerada recentemente.

O lançamento oficial do feijão Carioca 80 na bolsa de cereais aconteceu na primeira semana de setembro de 1986, segundo notícia na FOLHA DE SÃO PAULO (1986).

As sementes deste cultivar são de forma oblonga com coloração creme marmorizada com listras havana, com ou sem halo alaranjado. O peso médio de 100 sementes é de 22 g. Esse cultivar é fruto do programa de melhoramento genético do Instituto Agronômico de Campinas e originou-se de cruzamentos da variedade Cornell 49-242 trazida dos Estados Unidos da América do Norte, mas originário da Venezuela, com o Carioca. O Carioca 80 apresentou melhores características agronômicas tais como resistência a diversas raças de fungos da antracnose e da ferrugem que ocorrem em São Paulo, e ao vírus do mosaico comum (POMPEU, 1987).

Por outro lado, quanto à qualidade nutricional SGARBIERI, TESOTO E OLIVEIRA, 1985, mostraram a superioridade do cultivar Carioca 80 devido à maior digestibilidade e valor biológico de suas proteínas, que por sua vez, é explicada pela maior biodisponibilidade da metionina nas proteínas deste novo cultivar.

2.2. Composição em nutrientes

2.2.1. Composição centesimal aproximada

Dados da literatura apontam pequena variabilidade na composição de nutrientes entre feijões de um mesmo cultivar. As diferenças encontradas na composição reportadas por diversos laboratórios para um mesmo cultivar podem ser devidas às diferentes técnicas analíticas utilizadas, além de fatores ambientais tais como localização geográfica e sazonais.

MEINERS *et alii*, 1976, determinaram a composição centesimal aproximada das variedades de *Phaseolus vulgaris* cultivadas nos Estados Unidos da América do Norte encontrando valores médios de 20,6% para proteína, 1,20% para lipídios, 3,23% para cinza, 6,65% para fibra e 60,30% para carboidrato.

No Quadro 1 é apresentada a composição centesimal de alguns cultivares brasileiros.

QUADRO 1 Composição centesimal aproximada de feijões brasileiros (base seca).

Variedade e/ou Cultivar	Proteína %	Lipídios %	Cinza %	Carboidrato %	Fibra bruta %
Rico 23	25,53	2,12	4,20	62,48	5,67
Rosinha G2	25,77	1,85	3,79	64,02	4,57
Carioca	23,37	1,45	4,18	67,18	3,82
Piratã-1	23,62	1,25	3,58	67,42	4,13
$\bar{X}$	24,57	1,67	3,94	65,30	4,54 (a)
Bico de Ouro	23,52	0,86	2,58	61,84	5,49
Jalo	27,93	0,97	3,60	58,60	5,09
Goiano Precoce	31,62	1,04	3,87	53,30	4,75
Mulatinho	26,20	1,88	4,04	60,74	5,37
Rico 23	26,96	1,94	4,23	55,75	5,42
Preto G1	24,35	0,54	4,00	62,85	4,89
Pintado	24,97	1,40	3,62	60,68	4,80
Chumbinho Opaco	27,14	1,33	4,23	57,61	4,65
Rosinha G2	27,71	0,92	4,06	58,63	5,38
Roxão	26,43	0,39	3,81	60,27	5,73
Roxinho	24,38	2,18	4,56	63,68	4,60
Carioca	25,30	1,61	3,94	64,04	3,94
$\bar{X}$	26,38	1,26	3,88	59,78	5,01 (b)
Aroana	29,00	1,32	4,12	57,40	
Cara Suja	28,18	1,59	4,47	65,22	
Jalo	26,55	1,47	3,99	68,6	
Goiano Precoce	26,77	1,25	3,89	64,10	
Carioca	23,01	1,35	3,67	69,71	
Piratã-1	27,39	1,28	4,54	67,45	
Iguaçu	27,22	1,31	4,75	60,70	
Rico 23	24,45	1,06	5,11	60,77	
Aeté-1	26,18	1,09	5,10	60,70	
Aeté-3	25,03	1,03	4,12	65,26	
Rosinha G2	23,07	1,39	4,28	61,95	
Roxinho	25,45	1,33	4,97	61,91	
$\bar{X}$	26,02	1,29	4,42	63,6	(c)

(a) SGARBIERI, ANTUNES E ALMEIDA, 1979.

(b) MORAES E ANGELUCCI, 1971.

(c) DURIGAN, 1986.

Em trabalho recente, KOEHLER *et alii*, 1987, estudando a composição de nutrientes de 36 cultivares, incluindo 25 desenvolvidas nos últimos 15 anos, acharam que os teores de proteína, lipídios, cinza, eram similares aos reportados por outros autores.

2.2.2. Vitaminas e minerais

Com respeito às vitaminas e minerais, a revisão dos trabalhos de MORAES E ANGELUCCI, 1971; AUGUSTIN *et alii*, 1981 e KOEHLER *et alii*, 1987, revela que em feijões, as vitaminas mais representativas são a tiamina, riboflavina e a niacina. Os feijões não são considerados boa fonte de vitaminas lipossolúveis. Segundo AUGUSTIN *et alii*, 1987, 170 gramas de feijão cozido com 65% de umidade contribuem com 10% das recomendações (U. S. Recommended Dietary Allowances) para niacina e riboflavina, 10-12% para piridoxina e 25% para tiamina. No caso de niacina o aminoácido triptofano pode agir como precursor e tem sido sugerido que o conteúdo de triptofano do feijão poderia incrementar a potência efetiva do feijão como uma fonte de ácido nicotínico (TOBIN E CARPENTER, 1978).

Nesses mesmos trabalhos pode-se verificar que os feijões são boa fonte de K, P, e Mg, contendo quantidades menores, porém apreciáveis de Ca, Fe e Zn. Contudo, estudos realizados por SGARBIERI *et alii*, 1979, em 4 variedades brasileiras de feijão, indicou que a disponibilidade biológica do Fe nestas variedades é de apenas 4-5%.

REDDY *et alii*, 1988, reportam que 80% do P total está na forma de ácido fítico o qual ocorre na forma de complexo com cátions mono e divalentes nos cotilédones do feijão.

2.3. Proteínas do feijão

2.3.1. Generalidades e nomenclatura das proteínas de feijão

A literatura sobre proteínas de feijão foram revisadas por SGARBIERI E WHITAKER, 1982; MOSSE E PERNOLLET, 1983 e SATHE, DESHPANDE E SALUNKE, 1984. As proteínas presentes nos feijões são basicamente de dois tipos: (1) proteínas metabólicas, enzimáticas ou estruturais as quais são responsáveis pelas atividades normais da célula, incluindo a síntese de proteínas estruturais; e (2) proteínas de reserva as quais são fonte fornecedora de nitrogênio e esqueletos carbônicos no desenvolvimento durante a germinação (MILLERD, 1975).

Em feijão, assim como em outras sementes de leguminosas as proteínas de reserva perfazem cerca de 80% da proteína total e localizam-se em corpúsculos protéicos no citoplasma das células dos cotilédones. BOLLINI E CHRISPEELS, 1979, reportaram que a síntese das proteínas de reserva de *Phaseolus vulgaris* era o retículo endoplasmático e que o diâmetro dos corpúsculos protéicos era de 3-10 μ m.

Quanto à nomenclatura das proteínas de feijão parece existir certa confusão. Um dos primeiros a estudar proteínas de feijão foi OSBORNE, 1894, que fracionou as proteínas em três componentes faseolina, faselina e confaseolina. A faseolina representava 20% do peso total da semente ou cerca de 85% da proteína total; as duas outras frações representavam apenas 1-2% do peso total do grão ou 15-20% da proteína total.

Outros pesquisadores introduziram posteriormente nomes diferentes para as principais proteínas de reserva dos grãos de feijão. A faseolina, na nomenclatura de OSBORNE, foi chamada de glicoproteína II por PUSZTAI E WATT, 1970; componente α por ISHINO E ORTEGA, 1975; fração GI por SUN E HALL, 1975. De acordo com BOLLINI E CHRISPEELS, 1978, em *Phaseolus vulgaris* cultivar Greensleeves, as proteínas principais são a vicilina e a fitohemaglutinina, as quais perfazem respectivamente 50 e 10% do

total de proteína dos cotilédones da semente. Segundo estes autores, a vicilina é aparentemente idêntica à glicoproteína II descrita por PUSZTAI E WATT em 1970 e também à fração globulina GI descrita por McLEESTER et alii em 1973, enquanto que a fitohemaglutinina corresponderia à fração globulina GII, ambas localizadas nos corpos protéicos e catabolizadas durante a germinação, sugerindo que sejam proteínas de reserva.

2.3.2. Composição e algumas propriedades das proteínas de feijão

A composição em aminoácidos dos grãos de diversas variedades de *Phaseolus vulgaris* tem sido determinada (TOBIN E CARPENTER, 1978; PUSZTAI et alii, 1979; HANG, STEINKRAUS E HACKLER, 1980; MARQUEZ E LAJOLO, 1981; SGARBIERI E WHITAKER, 1982; KANAMORI et alii, 1982; PEACE et alii, 1988). As principais características de todas as variedades estudadas têm sido o elevado teor de lisina, quantidade limitante de aminoácidos sulfurados, (metionina, cistina e cisteína) tendo também baixos teores de triptofano. Ademais dos aminoácidos muitas proteínas de feijão contém carboidratos, portanto são glicoproteínas. O Quadro 2 mostra os perfis aminoacídicos e o teor de carboidratos para o feijão Rosinha G2, para o isolado protéico total deste cultivar e para as frações albumina e globulina (SGARBIERI, ANTUNES E JUNQUEIRA, 1982).

QUADRO 2 Carboidrato total, proteína e conteúdo de aminoácidos no feijão integral, isolado protéico e nas frações albumina e globulina do feijão Rosinha G2

Componente	Farinha de Feijão	Isolado Protéico	Fração Albumina	Fração Globulina
Lisina	8,80	8,77	7,52	8,07
Histidina	2,33	3,09	2,48	2,78
Arginina	6,40	6,87	4,34	4,90
Ác. aspártico	14,51	17,18	16,64	16,33
Treonina	5,17	6,10	6,49	4,50
Serina	6,62	8,84	7,67	8,08
Ác. glutâmico	19,53	18,22	16,63	22,73
Prolina	3,86	4,23	4,77	3,93
Glicina	4,35	5,03	5,01	4,16
Alanina	4,52	5,53	5,81	6,02
1/2 cistina	1,11	t	1,61	t
Valina	6,15	6,23	6,18	5,03
Metionina	1,30	1,31	1,71	1,00
Isoleucina	4,62	4,91	5,15	4,52
Leucina	9,70	10,94	10,04	10,72
Tirosina	2,56	4,84	3,23	3,78
Fenilalanina	5,86	7,14	6,53	6,39
Triptofano	1,03	1,89	3,21	1,70
Proteína (a)	23,20	75,20	70,30	91,10
Carboidrato (b)	57,60	23,01	27,70	8,10

Fonte: SGARBIERI, ANTUNES E JUNQUEIRA, 1982.

(a) % N X 6,25.

(b) Carboidrato total na farinha de feijão foi determinado por diferença (análise centesimal aproximada). Nas outras amostras pelo método colorimétrico de DUBOIS *et alii*, 1956.

Os aminoácidos estão expressos em g aminoácidos/100 g proteína

Segundo esses autores a fração albumina apresentou conteúdo mais elevado de aminoácidos sulfurados, menos proteína e mais carboidrato se comparado com a fração globulina. Uma explicação para esse alto teor de aminoácidos sulfurados é dada pelo fato de que a fração albumina possui muito mais atividade de inibidor de tripsina e é conhecido que a composição de inibidores de tripsina e quimotripsina isolados do feijão apresentam um conteúdo muito elevado de cistina na molécula e, à exceção do *Kidney bean*, nenhum triptofano. WHITAKER E SGARBIERI, 1981, SGARBIERI E WHITAKER, 1981, estudando a composição e a caracterização de três inibidores de tripsina e quimotripsina em feijão Rosinha G2 (o mais consumido no estado de São Paulo) comprovaram isto, encontrando que esses inibidores não continham triptofano nem valina, mas, por outro lado, eles eram ricos em resíduos de ácido aspártico, serina, cistina e prolina. Mas essa composição em aminoácidos dos inibidores de tripsina e quimotripsina, não afeta a composição total já que, segundo esses mesmos autores eles representam apenas 0,2% do total das proteínas solúveis em solução de cloreto de sódio. Entre os fatores tóxicos e/ou antinutricionais de origem protéica do feijão, as lectinas (fitohemaglutininas) contribuem mais do que os inibidores de enzimas digestivas à composição total de aminoácidos, já que podem representar até 10% da proteína total (PUSZTAI et alii, 1979).

JUNQUEIRA E SGARBIERI, 1981, isolaram do feijão Rosinha 62 uma lectina de peso molecular 136 Kda contendo 8,3% de carboidrato neutro mais 2,1% de glicosamina na molécula; apresentou conteúdo muito baixo de aminoácidos sulfurados e elevado teor de ácido aspártico, serina, treonina e triptofano.

ALLEN, SVENSON E YACHNIN, 1989, pesquisando uma lectina extraída do feijão norte-americano *red kidney* a qual tinha duas frações com atividade mitogênica e hemaglutinante encontraram que as frações continham composição em aminoácidos semelhante, porém a fração com maior atividade hemaglutinante continha cerca do dobro do carboidrato da fração com maior atividade mitogênica. As duas frações continham 2-amino-2-desoxiglicose e manose, ademais de pequenas quantidades de xilose, arabinose e fucose.

No Quadro 3 é apresentada uma comparação entre a composição em aminoácidos essenciais de algumas variedades de feijão com respeito ao padrão FAO/WHO (FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973)

Pode se ver que todos os cultivares contém lisina, leucina, e aromáticos em quantidades maiores que o padrão FAO/WHO, com exceção do *Great northern* que foi deficiente em leucina. Os aminoácidos sulfurados foram limitantes em todos os cultivares, enquanto que triptofano, treonina, valina e isoleucina são deficientes ou têm tendência de se-lo em algumas variedades. (SGARBIERI, ANTUNES E ALMEIDA, 1979; PUSZTAI *et alii*, 1979; KANAMORI *et alii*, 1982).

QUADRO 3 Comparação em aminoácidos essenciais de algumas variedades de feijão com o padrão FAO/WHO (mg/gN)

Componente	Lys	Thr	Met+Cys	Val	Ileu	Leu	Phe+Tyr	Trp
FAO/WHO	340	250	220	310	250	440	380	60
Rico-23	548	294	<u>183</u>	348	297	621	499	64
Rosinha G2	550	323	<u>151</u>	384	289	606	526	64
Carioca	428	263	<u>141</u>	<u>254</u>	<u>204</u>	454	461	73
Piratã (a)	409	283	<u>158</u>	<u>272</u>	<u>219</u>	484	514	83
Carmensita	450	250	<u>125</u>	325	294	481	606	ND
Cornell	469	<u>225</u>	<u>113</u>	319	294	488	638	ND
Pinto III	400	<u>213</u>	<u>138</u>	<u>294</u>	269	488	562	ND
Great Northern	394	<u>219</u>	<u>131</u>	313	<u>244</u>	<u>431</u>	506	ND
Processor (b)	394	256	<u>150</u>	325	250	450	538	ND
Kidney bean (c)	356	<u>231</u>	<u>106</u>	<u>294</u>	263	513	481	<u>56</u>
Kidney bean (d)	413	<u>213</u>	<u>106</u>	<u>294</u>	<u>231</u>	519	444	<u>38</u>
Caseína	459	265	<u>193</u>	407	351	518	636	78

(a) SGARBIERI *et alii*, 1979. sulfurados totais determinados como ácido cistéico e sulfona de metionina. Triptofano determinado no hidrolisado enzimático pela reação com p-dimetilaminobenzaldeído.

(b) PUSZTAI *et alii*, 1979. (c) e (d) KANAMORI *et alii*, 1982.

(c) colhidos em Burma. (d) colhidos no México. Os valores grifados são menores aos do padrão FAO/WHO.

O feijão quando misturado com cereais apresenta o fenômeno de "suplementação mútua" no qual a mistura de duas fontes protéicas mostra melhor qualidade do que cada uma em separado. Por causa do alto conteúdo de lisina as proteínas do feijão apresentam um efeito benéfico complementar quando consumidas com proteínas de cereais as quais têm como aminoácido limitante a lisina. Por outro lado, as proteínas de cereais são complementares às do feijão pela contribuição de aminoácidos sulfurados os quais são limitantes nas proteínas do feijão. (DUTRA DE OLIVEIRA E DE SOUZA, 1973).

Baseando-se na sua solubilidade, as proteínas de leguminosas foram classificadas por OSBORNE, 1924, em albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas. As quais são solúveis em água, em soluções diluídas de sais neutros, em soluções ácidas ou alcalinas diluídas, e em solução alcoólica 70-80%, respectivamente. A proporção relativa de cada uma das frações na semente é um dos fatores que determina a qualidade nutricional do total da proteína, isto porque cada fração tem diferente composição em aminoácidos (JOHNSON E LAY, 1974). Ainda esses mesmos autores sugerem que o alto teor de lisina nas leguminosas possa ser atribuído à alta proporção de globulinas e ao baixo conteúdo de prolaminas.

DESHPANDE E NIELSEN, 1987a, utilizaram a classificação de Osborne para as proteínas extraídas sequencialmente de 11 cultivares de feijão reportando que as albuminas e globulinas, juntas perfazem de 72-94 % do total de nitrogênio protéico com um valor médio de 81%. Os valores para prolaminas foram todos em torno de 1% do total de nitrogênio protéico, enquanto que as glutelinas ficaram numa média de 10% do total de nitrogênio protéico. A relação globulina/albumina foi de 0,87-2,26 com uma média de 1,34. Por outro lado, DURIGAN, SGARBIERI E ALMEIDA, 1987, reportam relações globulinas/albuminas entre 2,10-4,46 para 12 cultivares estudados.

2.4. Alguns fatores que afetam a qualidade nutricional do feijão.

2.4.1. Lectinas

O feijão cru da espécie *Phaseolus vulgaris* é tóxico, e só pode ser consumido quando cozido. Mesmo quando propriamente cozido a digestibilidade das proteínas do feijão é considerada baixa, se comparada a uma proteína de origem animal de boa qualidade. (DESHPANDE E NIELSEN, 1987a).

Autoclavando, a qualidade protéica dos grãos melhora pela inativação de fatores antifisiológicos, particularmente inibidores de proteases e lectinas, bem como pela desnaturação da proteína tornando-a mais suscetível ao ataque das enzimas digestivas (KADAM *et alii*, 1988).

As lectinas são proteínas que têm alto grau de especificidade para se combinar com certos sacarídeos e proteínas contendo sacarídeos. Foram inicialmente chamadas de hemaglutininas pelo fato dessas proteínas causarem aglutinação das células vermelhas do sangue de diversas espécies de animais. Do ponto de vista químico as lectinas são glicoproteínas apresentando teores de sacarídeos nas moléculas entre 5-13% e pesos moleculares na faixa entre 80 e 250 Kda (SGARBIERI E WHITAKER, 1982).

O termo lectina foi primeiro sugerido por BOYD E SHAPLEIGH, 1954 para denotar "substâncias de origem vegetal que aglutinavam eritrócitos e freqüentemente apresentavam alto grau de especificidade em relação a eritrócitos humanos de grupos sanguíneos específicos, bem como para células vermelhas de diferentes espécies animais".

LIENER, 1976, propôs que o termo lectina fosse usado como um termo genérico para todas as proteínas com especificidade de se combinar com açúcares, porém, chamando de fitolectina, zoolectina ou micolectina indicando se a lectina era de origem vegetal, animal ou microbiana.

As lectinas são especialmente abundantes nos cotilédones de grãos de leguminosas junto com as proteínas de reserva. TOMS E WESTERN, 1971, mas também podem estar presentes em menor proporção nas folhas, caule e raízes. Têm sido levantadas as mais diversas hipóteses acerca da possível ou possíveis funções fisiológicas das lectinas nas plantas. Algumas das funções sugeridas por GREER, 1983, são sumarizadas a seguir: a) proteínas de reserva, b) agentes de controle na diferenciação e divisão das células embrionárias, especialmente durante a germinação, c) transporte e armazenamento de açúcar, d) interação simbiótica entre as raízes das leguminosas e as bactérias fixadoras de nitrogénio; e) proteção contra o ataque de microrganismos (bactérias, fungus e virus) e de insetos.

ANGHARAD et alii, 1984, estudando o efeito de lectinas de *Phaseolus vulgaris* sob o crescimento de uma larva

(*Callosobruchus maculatum*), considerada a pior praga durante o armazenamento de sementes de leguminosas, concluíram que, frações protéicas de albuminas e globulinas, ambas, com atividade hemaglutinante foram tóxicas para essa larva. Mostraram que a lectina tipo E (ligante de eritrócito) foi a mais efetiva e sugeriram que o mecanismo de ação é análogo ao ocorrido no rato, já que, a ingestão de lectinas causa ruptura das células epiteliais do jejuno interferindo no transporte de nutrientes nessas células.

A especificidade de lectinas por resíduos de carboidratos e sua habilidade para estimular a modificação e divisão celular têm feito com que elas sejam de um grande valor na análise da estrutura e função celular. Devido a sua habilidade para aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade, são usadas na tipificação de sangue humano e na detecção de glicoproteínas em secreções (YAGI et alii, 1985).

Estruturalmente, as lectinas apresentam-se em formas moleculares múltiplas e poliméricas. MILLER et alii, 1975, demonstraram que as lectinas do feijão norte-americano "red kidney" são formadas de duas unidades estruturais (L e R) de mesmo peso molecular (34 Kda). A unidade L tem fortes propriedades leuco-aglutinantes e a unidade R propriedades éritro-aglutinantes.

A leuco-aglutinina (L-PHA) contém quatro sub-unidades L idênticas, ponto isoelétrico 5,25, forte afinidade por linfócito e fraca afinidade por eritrócitos. A éritro-aglutinina (H-PHA) é formada de quatro unidades R idênticas, ponto isoelétrico 5,95 e apresenta forte afinidade por eritrócitos. Considerando todas as possibilidades de combinação das sub-unidades L e R, as seguintes formas homólogas de lectinas poderiam se formar: L₄, L₃R, L₂R₂, LR₃ e R₄. As formas L₃R, L₂R₂ e LR₃ apresentam atividade mitogênica, sugerindo que essa atividade depende da presença da sub-unidade L na molécula de lectina.

A toxicidade das leguminosas varia muito entre espécies e mesmo entre variedades de uma mesma espécie. Em muitos casos, mas não necessariamente em todos, encontrou-se correlação positiva entre grau de toxicidade e atividade hemaglutinante; essa última observação veio a ser reforçada pelos trabalhos de JAFFÉ, BRÜCHER E POLOZZO, 1972 e JAFFÉ E BRÜCHER, 1972, que distinguiram quatro tipos de atividade hemaglutinante em extratos de diferentes variedades de feijão: 1. extratos que aglutinam eritrócitos de coelho e eritrócitos de bovino tripsinizados, tipo A; 2. extratos que aglutinam eritrócitos de coelho, tipo B; 3. extratos que aglutinam eritrócitos de bovino tripsinizados, tipo C; 4. não aglutinam nenhum dos dois tipos de eritrócitos, tipo D. Eritrócitos de hamster tratados com pronase detectavam os quatro tipos de atividade.

Quando ratos foram alimentados com feijões contendo lectinas dos tipo A e C perderam peso e morreram, enquanto que aqueles que receberam nas dietas com feijões dos tipos B e D não apresentaram sinais de intoxicação. Eles também encontraram que a atividade hemaglutinante sob eritrócitos humanos foi mais termolábil do que sua ação tóxica. Entretanto, quando usaram eritrócitos de bovino tripsinizados para monitorar a atividade hemaglutinante das lectinas (dos tipos A e C) tóxicas, submetidas a vários tratamentos térmicos, o poder hemaglutinante desaparecia paralelamente à toxicidade, enquanto que para outros tipos de eritrócitos verificou-se que a hemaglutinação desaparecia antes da toxicidade. Concluiu-se daí, que eritrócitos de bovino tripsinizados servem não apenas para detectar hemaglutininas tóxicas em *Phaseolus*, mas também para monitorar a eliminação da toxidez por efeito dos tratamentos térmicos.

TURNER E LIENER, 1975, eliminaram por cromatografia de afinidade as lectinas de um extrato protéico de soja; encontraram que a remoção das lectinas não melhorou o valor protéico das proteínas remanescentes. Concluíram deste estudo que as lectinas de soja são de pouca importância nutricional. Essa observação trouxe bastante dúvidas quanto à toxicidade das lectinas em soja crua. Por outro lado PUSZTAI, GRANT E PALMER, 1975, e PUSZTAI E PALMER, 1977, estudando a toxicidade do feijão "kidney cv. processor"

encontraram que este diminuía a utilização protéica pelo rato, expressa pela seguinte equação $NPU = NPU_{5\% \text{ caseína}} - 280X$, onde X representa a porcentagem de lectina na dieta. Por exemplo, 0,05 de lectina ativa na dieta diminuía o NPU de 82 para 68. Mostraram que tanto a fração albumina como as globulinas eram tóxicas, quando adicionadas à dieta com 5% de caseína. A fração albumina mostrou-se mais tóxica tendo sido a toxicidade relacionada à atividade hemaglutinante. As lectinas isoladas e adicionadas a uma dieta com 5% de caseína também afetou desfavoravelmente a utilização líquida da proteína (NPUD). Demonstraram também que o isolado protéico livre de lectina não apresentou efeito tóxico. Baseados nesses resultados sugeriram que o efeito tóxico do feijão "kidney cv. processor" deve ser atribuído à ação das lectinas.

O mecanismo responsável pela toxicidade e pelo efeito antinutricional das lectinas ainda não foi completamente elucidado. PUSZTAI, CLARK E KING, 1979, sugerem que o efeito tóxico das lectinas, quando ingeridas, poderia ser causado pela habilidade dessas proteínas de se ligarem a enterócitos intestinais causando lesões intestinais pela ruptura das microvilosidades do enterócito. Como resultado dessa ruptura poderá ocorrer interferência com a absorção normal de nutrientes da dieta e também a entrada na circulação de certa proporção dessas lectinas, que irão desencadear, no organismo, reações imunológicas, PUSZTAI et alii, 1981. Esses mesmos autores repor-

reportam também um balanço de nitrogênio negativo para ratos alimentados com dietas contendo lectinas, devido às grandes excreções de nitrogênio fecal e urinário.

HIGUCHI, TSUCHIYA E IWAI, 1984, em estudo com lectina de feijão alado prepararam uma fração com alta atividade hemaglutinante e pouca atividade inibitória de enzimas proteolíticas e administraram-na a ratos em crescimento em dieta contendo 10% de caseína. Observaram alta mortandade dos ratos em pouco tempo, porém quando a fração foi autoclavada os ratos ganharam peso de maneira similar aos do grupo controle. Eles reportaram um decréscimo nas atividades de algumas enzimas tais como sacarase, maltase, fosfatase alcalina, leucina aminopeptidase e glutamyl transferase. Também foi afetada a mucosa intestinal dos ratos, sugerindo que o efeito tóxico é iniciado pela ligação da lectina com as células epiteliais resultando em decréscimo na habilidade destas células para digerir e/ou absorver nutrientes, impedindo o processo de maturação normal das células epiteliais. Sabe-se ainda que pelo menos em lectinas de feijão alado e mamona a modificação com N-bromosuccinimida causa concomitante perda de atividade hemaglutinante com a oxidação do resíduo de triptofano, sugerindo que pelo menos um resíduo de triptofano está associado com a atividade da lectina (HIGUCHI, OHTAMI E IWAI, 1986; ABSAR, YAMASAKI E FUMATSU, 1986).

2.4.2. Inibidores de enzimas digestivas

Inibidores de enzimas digestivas, tanto proteolíticas como amilolíticas, têm sido encontrados em feijões e em muitos casos isolados e purificados por vários pesquisadores (WHITAKER E SGARBIERI, 1981; SGARBIERI E WHITAKER, 1982; SAITO *et alii*, 1987; FRELS E RUPNOW, 1985; NIELSEN E LIENER, 1988).

Os inibidores de enzimas proteolíticas que têm sido mais estudados são o inibidor de Kunitz e o de Bowman-Birk. Eles diferem marcadamente em algumas propriedades, e.g., o inibidor de Kunitz contém duas ligações disulfeto/molécula e contém mais resíduos de glicina, valina, leucina, isoleucina e arginina do que o inibidor de Bowman-Birk, além de ter um peso molecular maior que esse último. O inibidor de Bowman-Birk contém sete ligações disulfeto/molécula, não contém glicina e é relativamente pobre em resíduos de valina, leucina, isoleucina e arginina. Esse inibidor tem a característica de ser mais estável ao calor e a pH baixos (SGARBIERI E WHITAKER, 1982).

Os inibidores são normalmente denominados com o nome da primeira enzima contra a qual foram testados. No caso de feijão, existem inibidores que reagem com a tripsina 1:1, ou seja,

um mol do inibidor com um mol de tripsina e esses inibidores têm pesos moleculares variando de 8 a 10 Kda, porém, também encontram-se cultivares que apresentam inibidores que reagem numa relação de 1:2, ou seja, um mol do inibidor, inibe dois moles de tripsina. Entre esses cultivares encontram-se navy bean, pinto bean e Rosinha G2 que apresentam inibidores com peso molecular entre 19 e 23 Kda (SGARBIERI, 1989). Neste mesmo trabalho o autor sumariza o estado atual de conhecimentos sobre os vários efeitos fisiológicos dos inibidores de tripsina-quimotripsina: a) hipertrofia e hiperplasia do pâncreas, b) estímulo à secreção pancreática, particularmente de enzimas pancreáticas, c) aumento dos requerimentos de metionina devido ao incremento de conversão de metionina para cisteína causada pela grande incorporação de cisteína nas proteínas pancreáticas.

SGARBIERI, ANTUNES E JUNQUEIRA, 1982, demonstraram que a adição de 1% de inibidor isolado de feijão Rosinha G2 a uma dieta com 10% de caseína administrada a ratos em crescimento, durante 10 dias, não teve efeito sobre a utilização da caseína pelos ratos. Ressalvando que, são necessários estudos de longa duração para poder avaliar as conseqüências da alteração fisiológica do pâncreas.

2.4.3. Taninos

Qualquer composto polifenólico que possua a habilidade de precipitar proteínas em solução aquosa, pode ser considerado um tanino. Eles ocorrem em ampla variedade de plantas, onde freqüentemente desempenham papel protetor ao ataque de microrganismos. Presumivelmente, a eficiência do tanino em proteger a planta da invasão de microrganismos resulta da forte afinidade dos taninos pelas enzimas digestivas secretadas por estes (SWAIN, 1965).

Normalmente eles encontram-se na faixa 0,5 a 3 Kda de peso molecular, tendo sido reportados taninos com peso molecular até 28 Kda (JONES, BROADHURST, LYTTLETON, 1976). Existem outros compostos que podem ser agentes tánicos, sem por isto ser taninos vegetais, tal é o caso de sais metálicos ou formaldeído. Por outro lado existem compostos fenólicos que respondem aos testes químicos de taninos, porém, mesmo que se liguem a proteínas não são considerados taninos por não chegarem a precipitá-las.

Em geral a formação do complexo tanino-proteína tem sido atribuída largamente à formação de ligações múltiplas de hidrogênio entre os grupos orto-hidroxil de taninos e os grupos carbamil das proteínas e peptídios, (LOOMIS E BATTAILE, 1966). Entretanto, evidências recentes sugerem que as interações

hidrofóbicas devem ser as forças mais importantes na formação dos complexos tanino-proteína (OH *et alii*, 1980). OH E HOFF, 1987, estudando a dependência do pH na formação de complexos entre taninos e proteínas mostraram que os taninos condensáveis precipitam proteínas mais eficientemente a valores de pH próximos do ponto isoelétrico da proteína onde a repulsão eletrostática é mínima.

De acordo com SIEVWRIGHT E SHIPE, 1986, a digestibilidade da proteína em feijões parece ser reduzida pelas interações taninos-proteína, especialmente de taninos de alto peso molecular. O primeiro efeito antinutricional dos taninos quando introduzidos numa dieta em níveis de 1-2% são diminuição no crescimento e diminuição na eficiência da dieta (GLICK E JOSLYN, 1970a). Esses mesmos autores reportam que em experimentos com ratos em dieta hiperprotéica de caseína, mesmo com 5% de ácido tânico nas dietas os ratos ganharam peso de maneira similar aos do grupo controle.

ELIAS, FERNÁNDEZ E BRESSANI, 1979, estudando a possível relação entre a cor da casca e o valor nutritivo das proteínas do feijão, obtiveram resultados indicativos de que os pigmentos presentes na casca contém taninos e outros polifenóis que podem reagir com as proteínas diminuindo a digestibilidade e como consequência a qualidade protéica. Eles estudaram feijões de

casca vermelha, preta, branca e um mutante de cor intermediária. A atividade hemaglutinante localizou-se nos cotilédones com baixa ou nenhuma atividade nas cascas. A atividade do inibidor de tripsina foi influenciada por um fator termolábil (inibidor de tripsina verdadeiro) e por um fator resistente ao calor (taninos). A atividade do fator termolábil foi maior nos cotilédones (16-18 UTI/mg de amostra) do que na casca. Os feijões vermelhos e pretos continham uma alta concentração do fator resistente ao calor nas cascas (23-31 UTI/mg de amostra) o qual era bem menor para o feijão branco (7-9 UTI/mg de amostra). A concentração de taninos foi maior nas cascas vermelha e preta, 38-43 mg/g de amostra, e baixa nas cascas de feijão branco, 1,3 mg/g de amostra, sendo que nestes feijões brancos os taninos tiveram maior concentração nos cotilédones do que nas cascas, 3,8-5,9mg/g de amostra. Foi encontrada alta correlação entre concentração de taninos na casca e atividade inibitória da tripsina, não havendo correlação entre esses dois parâmetros nos cotilédones. Após autoclavar os feijões o inibidor de tripsina foi contudo detectado nos feijões coloridos integrais bem como no caldo de cocção e muito pouca atividade inibitória foi encontrada nos feijões brancos. A influência da cor foi confirmada ao cozinhar separadamente os cotilédones das cascas tendo havido um decréscimo na atividade do inibidor de tripsina tanto na casca como nos cotilédones, porém esse efeito foi mais pronunciado no caso dos cultivares de cor branca.

BRESSANI *et alii*, 1983, estudando os métodos de análise para taninos em feijões e seus efeitos na qualidade protéica sugeriram que pequenas quantidades de compostos polifenólicos podem ser absorvidos e desintoxicados num processo que utiliza metionina como um doador de grupos metilo, fazendo com que aumente a deficiência de metionina. De acordo com essa hipótese a adição de metionina melhoraria mais a qualidade protéica de *Phaseolus vulgaris* com altos teores de taninos quando comparados com cultivares de baixo teor. Assim a adição de metionina não apenas melhoraria a qualidade da proteína de feijão como também contribuiria com seu efeito desintoxicador. Por outro lado, PHILLIPS *et alii*, 1981 reportam que o teor de polifenóis não parece alterar a utilização de aminoácidos sulfurados.

AW E SWANSON, 1925, avaliaram a influência de taninos sobre a digestibilidade e qualidade de "black beans" usando um bioensaio com *Tetrahymena termophyla*. A digestibilidade e o PER apresentaram relação inversa com o teor de taninos. A biodisponibilidade da globulina G1 na presença de taninos condensáveis de "black beans" teve alta correlação positiva com a digestibilidade *in vitro* da proteína, expressa pelo crescimento da *Tetrahymena*. Os taninos condensáveis complexaram rapidamente com a globulina G1 formando precipitados insolúveis os quais foram resistentes à digestão com pepsina em pH 2,0. A digestão dos complexos

tanino-proteína ficou na faixa de 69-74% a pH 8,0 usando o sistema multienzimático de tripsina, quimotripsina e peptidase. Encontraram também que macerando por 18 horas houve um aumento na quantidade de taninos retidos nos cotilédones com conseqüente decréscimo na digestibilidade. Fatos esses que não foram observados em feijões brancos. Foi proposto que os taninos hidrossolúveis difundem-se para os cotilédones e aparentemente reagem com as proteínas durante o cozimento reduzindo a digestibilidade. A difusão de taninos hidrossolúveis para os cotilédones durante a maceração é suportada pelo fato de que foram detectados taninos nos cotilédones de feijões pretos macerados em água, mas não nos macerados em heptano. A digestibilidade dos feijões macerados em água foi menor do que os macerados em heptano.

GLICK E JOSLYN, 1970b, observaram boa utilização da proteína dietária em ratos alimentados com dietas com 5% de ácido tânico misturado à caseína marcada com carbono-14. A excreção proteica para ratos alimentados com dieta contendo tanino foi 33% e 18% do ingerido, enquanto que para os ratos controle foi 6% e 1%. Durante um período de 84 horas de coleta, menos que 5% do C^{14} tinha sido excretado por qualquer dos dois ratos do grupo controle. Essa observação juntamente com a de que tinha havido um incremento nos níveis da atividade proteolítica intestinal, levaram a deduzir que as proteínas enzimáticas ou outras de origem endógena constituem os principais compostos nitrogenados excretados.

2.4.4. Resistência à hidrólise enzimática das proteínas do feijão

Além dos fatores antinutricionais presentes em feijões os quais afetam adversamente a utilização protéica, tem sido encontrado em alguns estudos que a proteína *per se* é resistente a digestão (CIENER E THOMPSON, 1980). ALMQUIST, CHRISTENSEN E MAUSEK, 1980, atribuem a baixa digestibilidade de algumas leguminosas à presença de regiões no centro da proteína os quais contêm alto teor de cistina, e aos inibidores de tripsina os quais têm sido demonstrado não liberam a cistina quando incubados com proteases. ROMERO E RYAN, 1978, estudaram a digestibilidade *in vitro* por tripsina, quimotripsina e pepsina da globulina G1 de três variedades de *Phaseolus vulgaris*, monitorando a extensão da hidrólise por eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS. Concluíram que um certo número de peptídios é hidrolisado por tripsina, porém um número relativamente grande de peptídios foram resistentes à hidrólise. Após tratamento térmico da globulina G1 houve aumento substancial na digestibilidade. MARQUEZ E LAJOLO, 1981, reportaram também uma drástica redução na digestibilidade de albuminas após autoclavagem. Eles postularam como possíveis causas o impedimento estérico ou bloqueio dos resíduos específicos necessários à ação enzimática, embora não descartassem a possibilidade de complexação da proteína por algum tipo de fenol

ou quinona, tendo observado aparecimento de agregados de alto peso molecular. Por outro lado, segundo DESHPANDE E NIELSEN, 1987a, 1987b, todas as teorias acerca da resistência da faseolina à hidrólise enzimática por proteases, as quais incluem questões estruturais, estrutura compacta, estabilidade conferida a sua estrutura tridimensional pelos carboidratos e impedimentos estéricos das proteases pelas cadeias sacarídicas, são falsas. Nenhuma das teorias propostas na literatura a respeito da resistência desta proteína às proteases de mamíferos têm base sólida. Estes autores fazem essa afirmação baseados no estudo de 17 variedades de *Phaseolus vulgaris* L., no qual foi pesquisada a suscetibilidade da principal proteína de reserva, faseolina, a diferentes proteinases. Entre as proteinases serínicas, a tripsina, subtilisina e pronase E hidrolisaram rapidamente a faseolina in natura. A faseolina apenas foi resistente à pepsina.

2.4.5. Outros compostos antinutricionais de origem não protéica.

Há compostos de baixo peso molecular, termoresistentes de origem não protéica que interferem de alguma maneira com a fisiologia animal e com a própria utilização de nutrientes pelo organismo. Entre esses, além dos já mencionados taninos e outros compostos fenólicos comumente encontrados em *Phaseolus vulgaris*, existem as saponinas que, se por um lado alguns autores atribuem-

lhes propriedades hipocolesterolêmicas (CURL, PRICE E FENWICK, 1988), outros autores entre eles (JOHNSON, *et alii*, 1986; SOUTHON, *et alii*, 1988) mostraram que as saponinas podem aumentar a permeabilidade do intestino delgado *in vitro* ocasionando alterações no transporte de nutrientes.

Tem sido sugerido também que o fitato diminui a biodisponibilidade de Ca, Mg, Zn e Fe e que, possivelmente, interfere na utilização de proteínas devido à formação de complexos fitato-proteína e fitato-mineral. (REDDY, SATHE E PIERSON, 1988).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Feijão utilizado

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o feijão pertencente à Classe *Dicotyledoneae*, Família *Leguminosae* e Espécie *Phaseolus vulgaris*, cultivar Carioca 80, safra 1984, fornecido pela seção de leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas e cultivadas na estação experimental deste mesmo Instituto.

3.1.2. Reagentes usados nas determinações químicas e bioquímicas

Os reagentes empregados nas determinações químicas foram todos de grau analítico e de diversas procedências (Merck, Sigma, Ecibra, etc). Para as determinações bioquímicas, as enzimas foram: tripsina de pâncreas bovino (Sigma), pepsina (Riedel). Sangue bovino foi gentilmente fornecido pelo Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de Nova Odessa, São Paulo, recebido em citrato de sódio a 3,85% como anticoagulante, sendo o sangue utilizado no dia seguinte.

3.1.3. Material e animais utilizados nos ensaios biológicos

Para os ensaios biológicos utilizaram-se ingredientes comerciais, de diversas procedências, a saber: caseína comercial (Indústria e Comércio de Laticínios Tacrigy Ltda.), amido de milho (Maizena), óleo refinado de milho (Mazola), açúcar refinado (União), vitaminas (Merck). Ração comercial Du Coelho, Anhanguera-Duratex S.A., com 17% de proteína, valor fornecido pelo fabricante.

Os animais utilizados foram ratos albinos fêmeos e machos, (Rattus EPM-Wistar) provenientes do biotério da Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

3.1.4. Vidraria e aparelhos utilizados

Na execução das análises, além da vidraria, aparelhos e utensílios indispensáveis de laboratório, utilizaram-se os seguintes equipamentos e aparelhos específicos:

- Balança semi-analítica Sauter
- Balança "Filizola"
- Estufa Fanem Ltda. S. Paulo
- Digestor Sarge Aparelhos Científicos Ltda.

- Destilador Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda.
- Mufla Forlabo
- Liofilizador Virtis 10-146 MR-BA
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B
- Extrator Goldfish
- Membranas de celulose para diálise
- Gaiolas comuns de tela
- Gaiolas metabólicas
- Banho-maria com controle de temperatura
- Liquidificador Walita com oito velocidades
- Espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer
- Espectrofotômetro Baush & Lomb Spectronic 20
- Agitador magnético com controle de temperatura Thermolyne
- pHmetro Corning
- Evaporador rotativo-RE Büchi
- Circulador de água fria com compressor Savant RWC-50A
- Bomba de vácuo Marvac 2RRI
- Analisador automático de aminoácidos Beckman 119-CL
- Centrífuga Damon/IEC Division I.E.C. HN-S Centrifuge
- Cromatografo de gases Perkin-Elmer Sigma 3B com detector de ionização de chama e integrador LCI-100

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Fracionamento do feijão Carioca 80

Na preparação do material os grãos previamente lavados foram colocados em maceração, por 16 horas à temperatura ambiente (25°C). Findo o tempo de maceração, procedeu-se à remoção dos tegumentos (casca), constituindo este material, depois de liofilizado, a fração FRO. Os cotilédones livres do tegumento foram submetidos a homogeneização (liquidificador) e extraídos com água por 30 minutos com agitação magnética numa relação sólido líquido de 1:5, obtendo-se por centrifugação (16.319 X'g, 5°C, 20 min.) um resíduo e uma fração solúvel em água. Esta, após filtração em lã de vidro foi dialisada contra água destilada em geladeira a 4°C durante 72 horas, com troca de água a cada 6-8 horas, utilizando-se membranas de celulose permeáveis a compostos com peso molecular até 8 Kda. Após diálise realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições, obtendo-se duas frações que liofilizadas, constituíram as frações FR2 e FR3, basicamente globulinas e albuminas, respectivamente. O resíduo obtido na primeira extração com água foi re-extraído com solução salina 0,3 N (30 min. agitação magnética, sólido/líquido 1:5) obtendo-se após centrifugação, nas mesmas condições anteriores um resíduo que foi congelado e posteriormente liofilizado fornecendo a fração FR4. A

fração solúvel nesta solução foi submetida a diálise nas mesmas condições anteriores congelada e liofilizada, sendo essa fração chamada de FR5. O fracionamento utilizado é esquematizado no fluxograma apresentado na figura 1.

3.2.2. Determinações químicas

3.2.2.1. Umidade

A umidade foi determinada segundo o método descrito na AACC 44-31.

3.2.2.2. Matéria graxa

Determinou-se segundo o método descrito na AACC 30-25, utilizando-se o aparelho de Goldfish. O solvente utilizado foi o hexano.

3.2.2.3. Cinza

A determinação foi feita segundo o método descrito na AACC 08-16.

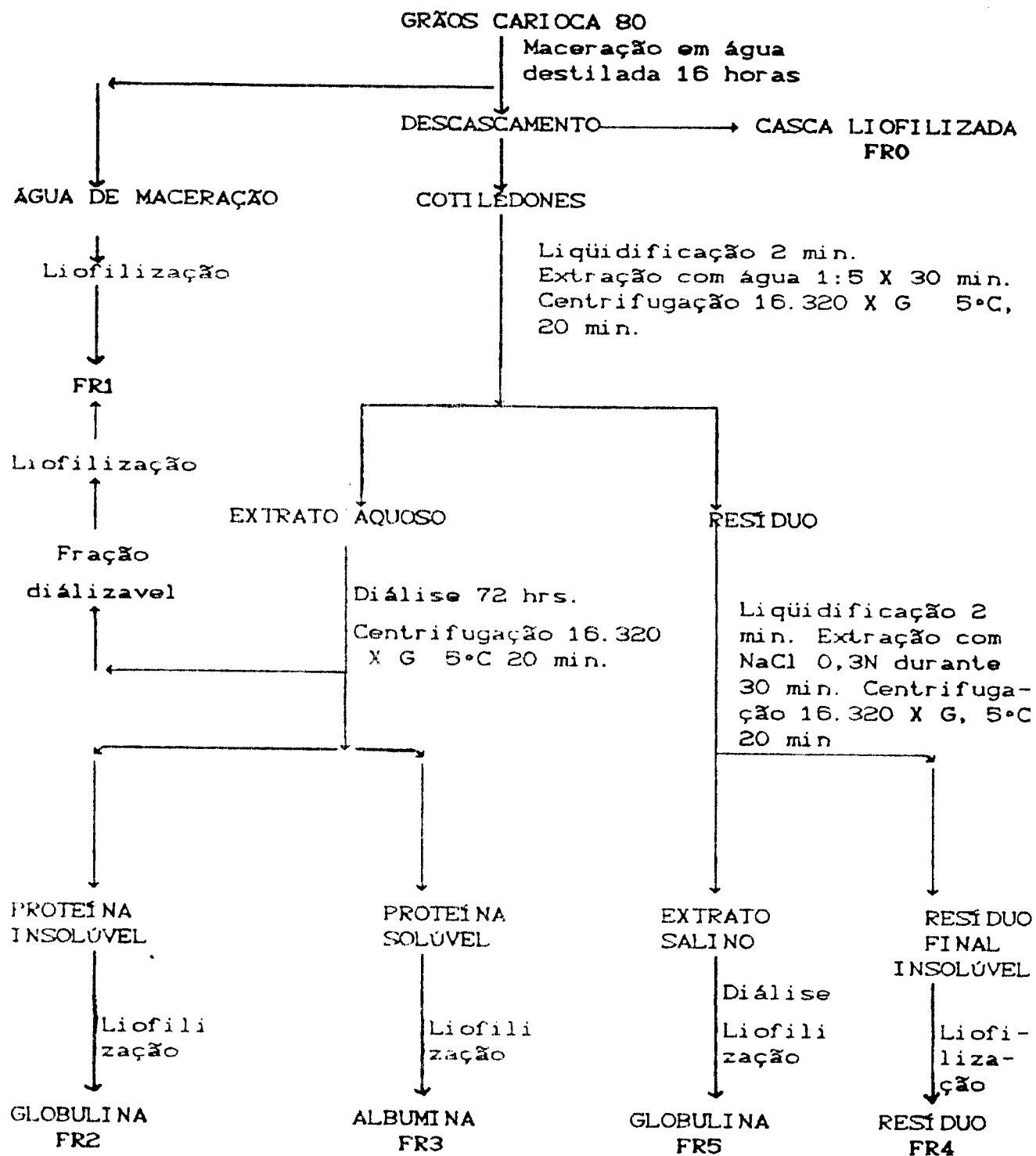


FIGURA 1 Fracionamento dos grãos de feijão para a obtenção das frações FR0-FR5 (FR = Fração)

3.2.2.4. Fibra crua

Determinou-se segundo o método de VAN DE KAMER E GINKEL, 1952.

3.2.2.5. Carboidrato total

O preparo das amostras para determinação do conteúdo de carboidratos foi feita conforme o método preconizado por KANESIRO *et alii*, 1977. O método utilizado foi o da reação com fenol-ácido sulfúrico de DUBOIS *et alii*, 1956. Os resultados foram expressos com base em curva padrão de glicose.

3.2.2.6. Proteína bruta

As dosagens de nitrogênio nas fezes, urinas e amostras das dietas e frações de feijão Carioca 80 foram realizadas pelo método semimicro-Kjeldahl, baseado na destruição da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico concentrado, reduzindo-se em parte a SO_2 , que por sua vez, reduz o nitrogênio da matéria orgânica a amoníaco. Pela reação deste com o ácido sulfúrico forma-se sulfato de amônio, estável nas condições de trabalho. A digestão do material foi feita utilizando-se como catalizador uma mistura de 92,5% de sulfato de potássio, 6,5% de sulfato de cobre

e 1% de óxido de titânio. O teor de proteína bruta foi calculado, multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 8,25, segundo AACC 46-12.

3.2.2.7. Determinação de ácidos graxos

Foi feita cromatografia dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, os quais, foram derivatizados por transmetilação com trifluoreto de boro a 14 % em metanol, seguindo-se uma extração com n-heptano e concentração sob atmosfera de nitrogênio, segundo AOCS Ce 2-66. As condições analíticas foram: fluxo de nitrogênio 20 mL/min., coluna 2 m X 4 mm, 15% DEGS (dietileno-glicolsuccinato) sobre chromosorb W, 190°C.

3.2.2.8. Aminoácidos totais

Os aminoácidos totais foram determinados pelo método de troca iônica de SPACKMAN, STEIN E MOORE, 1958, usando-se um analisador automático Beckman modelo 119-CL. As amostras foram preparadas seguindo as recomendações descritas no manual do aparelho (Beckman Instruments, 1966). Uma quantidade conhecida de proteína contendo entre 25-30 mg foi hidrolisada em aproximadamente 35 mL de HCl 6N a 110°C durante 22 horas, em tubos pyrex (N° 9825, de 12 X 150 mm) providos de arruela de teflón,

hermeticamente fechados e na ausência de oxigênio. O hidrolisado foi filtrado em vidro G-4, completando-se o volume para 100 mL. Deste volume tomou-se uma alíquota de 20 mL, a qual foi evaporada em evaporador rotativo com bomba de vácuo, banho entre 50-55 °C e circulação de água refrigerada a 0 °C da seguinte forma: uma primeira evaporação do ácido foi seguida de duas evaporações, lavando-se o resíduo de cada vez com 10 mL de água destilada. O hidrolisado final foi dissolvido em 5 mL de tampão citrato de sódio 0,2N em Na⁺, pH 2,2, filtrado através de membrana millipore e aplicados 100 µl dessa solução na coluna de cromatografia. Uma vez corrido o aminograma, calcularam-se quantitativamente os aminoácidos das amostras, utilizando-se de mistura padrão de aminoácidos e procedimento preconizado pela Beckman. Como a hidrólise ácida destrói completamente o triptofano, este foi quantificado separadamente.

3.2.2.9. Determinação de triptofano

A determinação de triptofano foi feita de acordo com o método proposto por SPIES, 1957, modificado por AMAYA, YOUNG E CHICHESTER, 1977. As amostras foram pesadas em tubo de polipropileno, adicionando-se 8 mL de KOH 5N. A hidrólise foi realizada em autoclave a 110 °C por 4 horas. O produto foi transferido quantitativamente para balão volumétrico e neutralizado

com HCl 8N; em seguida completou-se o volume a 50 mL com água desionizada. O material foi então filtrado e alíquotas de 1 mL foram utilizadas. A cada alíquota acrescentou-se 0,5 mL de p-dimetilaminobenzaldeído (DAB) e 4,5 mL de H_2SO_4 19N mantendo-se por uma hora na ausência de luz. Adicionou-se depois 0,1 mL de $NaNO_2$ (0,04%) e após 20 minutos fez-se a leitura em espectrofotômetro a 800 nm, contra um branco livre do aminoácido. A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de triptofano puro.

3.2.2.10. Aminoácidos livres

Para a extração dos aminoácidos livres utilizou-se o ácido sulfosalicílico (ASS) e a determinação quantitativa foi feita no mesmo aparelho usado na dosagem de aminoácidos totais. Esse método foi proposto pela Beckman, 1977, e consistiu na extração da farinha ou das frações de feijão com ASS 3,5%, durante 15 minutos com agitação, e posterior centrifugação a 8000 rpm/10 min, (Centrifuga Damon/IEC Division I.E.C. HN-S Centrifuge). Uma alíquota era retirada desse extrato livre de proteínas e diluída em tampão citrato de lítio 0,15N e analisada. A mistura padrão é fornecida pela própria Beckman. Para a quantificação todas as determinações foram monitoradas pela mistura padrão.

3.2.2.11. Determinação de taninos

Determinados pelo método da vanilina segundo PRICE, SOCOYOC E BUTLER, 1978, no qual as amostras são extraídas com metanol durante 20 minutos em agitação magnética e centrifugadas. Dois mL do extrato são misturados com 2,5 mL de HCl concentrado dissolvido em metanol 8% (v/v). Aos tubos com amostra são adicionados 2,5 mL de vanilina em metanol (1% p/v); aos brancos adicionaram-se 2,5 mL de metanol. Após 20 minutos foi lida a absorbância a 500 nm em espectrofotômetro.

3.2.3. Determinações bioquímicas

3.2.3.1. Atividade do inibidor de tripsina

O ensaio para a determinação da atividade dos inibidores de enzimas proteolíticas foi proposto por KUNITZ, 1947, e consiste na determinação da digestão da caseína pela enzima, na presença e na ausência do inibidor. Para a determinação da atividade do inibidor de tripsina seguiu-se a modificação proposta por KAKADE, SIMONS E LIENER, 1969.

Uma unidade de tripsina foi arbitrariamente definida como um incremento de 0,01 unidade de absorbância a 280 nm, mistura de reação 10 mL, tempo de incubação 20 min sob condições

pre-estabelecidas de concentração enzimática, temperatura e pH. Calcularam-se as unidades de tripsina inibidas (UTI) pela diferença entre as unidades totais de tripsina (UT) na ausência de inibidor e da amostra contendo o inibidor.

3.2.3.2. Digestibilidade da proteína *in vitro*

Para esse ensaio seguiu-se fundamentalmente, o procedimento descrito por AKESON E STAHMANN, 1964, baseado na hidrólise enzimática das proteínas em pH ácido com pepsina, seguida de hidrólise em condições alcalinas com pancreatina e precipitação da proteína não digerida com ácido tricloroacético.

3.2.3.3. Determinação da atividade hemaglutinante

No preparo das hemácias o sangue bovino foi centrifugado a 600 X g durante cinco minutos para se eliminar o plasma. As hemácias obtidas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada (tampão fosfato 0,01M pH 7,0 contendo 0,15 M de NaCl) e resuspensas a 4% (v/v) em solução salina contendo 0,1% de tripsina bovina. Logo após incubação por uma hora a 37 °C a suspensão foi centrifugada nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se a operação de lavagem três vezes, com solução salina 0,85% a 4 °C, obtendo-se no final suspensão a 4% de células (v/v) na solução salina.

A atividade hemaglutinante foi determinada pelo método de microtitulação, com o equipamento "micro-titer" (Cole Eng. Comp., Alexander, Virginia, USA) e consiste em diluir as amostras em progressão geométrica. O título hemaglutinante é definido como a maior diluição capaz de provocar aglutinação macroscópica após uma hora, meia hora a 37°C e mais meia hora a 25°C.

3.2.4. Ensaios biológicos com ratos

3.2.4.1. Procedimento na formação dos grupos de ratos

A distribuição dos ratos nos grupos que receberam os diferentes tratamentos foi feita pelo procedimento Cornell preconizado por HACKLER, 1978, da seguinte maneira: os ratos foram pesados ao chegarem ao laboratório e após um período de adaptação; seguiu-se a distribuição por peso e, finalmente, o agrupamento dos ratos por ordem descendente de peso. Feito isso os grupos de ratos foram distribuídos ao acaso nas diferentes dietas experimentais. No Quadro 4 é mostrado o método exemplificando com cinco grupos de cinco ratos cada.

QUADRO 4 Procedimento na formação dos grupos de ratos

Passo 1			passo 2									
Nº. rato	peso corpóreo gramas		Distribuição por peso dos ratos logo após adaptação (gramas)									
	Ao chegar	Após adaptação	64	63	62	61	60	59	58	57	56	
1	43	57	19a	17a	9	5	2	4	11	1	8a	
2	45	60		27a	14	10	6	12	23	3	30a	
3	39	57			16	13	21	20		7		
4	43	59				15	29	24		26		
5	44	61				18		25		28		
6	42	60				22						
7	41	57										
8	40	56										
9	45	62										
10	42	61										
11	42	58										
12	43	59										
13	42	61										
14	44	62										
15	43	61										
16	43	62										
17	44	63										
18	43	61										
19	46	64										
20	42	59										
21	42	60										
22	46	61										
23	42	58										
24	43	59										
25	45	59										
26	42	57										
27	44	63										
28	44	57										
29	43	60										
30	46	56										

a: Os maiores e menores são descartados

Passo 3									
Distribuição em 5 grupos de 5 ratos cada									
Grupo j		Grupo k		Grupo l		Grupo m		Grupo n	
Nº.	P.	Nº.	P.	Nº.	P.	Nº.	P.	Nº.	P.
9	62	14	62	16	62	5	61	10	61
2	60	22	61	18	61	15	61	13	61
6	60	21	60	29	60	4	59	12	59
23	58	11	58	25	59	24	59	20	59
1	57	3	57	7	57	26	57	28	57
297		298		299		297		297	
$\bar{X}$	59,4		59,6		59,8		59,4		59,4

Nº. = Número de rato
P. = Peso corpóreo

Fonte: HACKLER, 1978.

3.2.4.2. Descrição dos ensaios biológicos realizados

Os ratos recém-desmamados (21-25 dias), eram colocados com ração comercial e água *ad libitum*, temperatura ambiental dentro da faixa de neutralidade térmica para o rato ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa entre 50-60% e com um ciclo luz-escuro de 12 horas alternadas. O período de aclimação variou de 3-6 dias dependendo do peso desejado, que por sua vez, dependia da quantidade da fração de feijão que entrava no preparo das dietas a serem testadas; 3, 5, ou 8%.

Logo após a aclimação, tinha início o ensaio propriamente dito com uma duração de nove dias, sendo que, os quatro primeiros dias eram de adaptação às dietas testes e nos cinco dias finais eram coletadas urina e fezes, sendo que o nitrogênio era calculado da quantidade de dieta consumida. Para isso foram utilizadas gaiolas metabólicas individuais, as quais permitem a separação de fezes e urina. O consumo de alimento foi medido cuidadosamente, levando-se em consideração todo alimento jogado fora dos comedouros pelos ratos e evitando-se ao máximo a mistura de alimentos com as fezes e/ou urina. Para isso, contribuiu em muito a utilização de uma rede de nylon colocada num ângulo de aproximadamente 60° nos funis debaixo das gaiolas. A urina era coletada num erlenmeyer contendo 20 mL de ácido sulfúrico a 50%, e diluída até a um volume de 100 mL. Aliquotas foram retiradas como amostras e guardadas em congelador até o

momento das dosagens. As fezes foram secadas a 45°C durante um dia, moídas em gral de porcelana até perfeita homogeneização e guardadas em frascos herméticos até serem feitas as determinações de nitrogênio.

3.2.4.3. Preparo das dietas

Na realização dos ensaios biológicos, as dietas foram preparadas conforme FRIEDMAN, 1975; AOAC, 1975; ALLISON, 1964. A mistura mineral usada seguiu as especificações de ROGERS E HARPER, 1965, e a composição da mistura vitamínica foi baseada na Nutritional Biochemicals Corporation (NBC), catálogo de 1977/1978, Cleveland, Ohio (USA). Foram feitos quatro diferentes ensaios de balanço de nitrogênio, que foram designados com romanos I, II, III e IV. O ensaio I utilizou 20% de proteína proveniente de caseína, mais o aporte protéico dado por 3% (p/p) de cada fração neste ensaio, não foi testada a fração FR1. O ensaio II foi feito com dietas contendo 10% de proteína oriunda de caseína e de 5% (p/p) de cada uma das frações obtidas no esquema de fracionamento da Figura 1 (FR0, FR1, FR2, FR3, FR4 e FR5); essas dietas permaneciam isoprotéicas às expensas da caseína. Neste ensaio, foi incluída além das dietas com as frações, uma dieta contendo 25% de feijão integral. Os dois últimos ensaios foram com 10% de proteína em cada uma das dietas, proveniente de caseína e de 8% (p/p) de cada uma das frações, mantendo as dietas isoprotéicas às expensas da

QUADRO 5 Composição da mistura salina utilizada nas dietas

Componentes	%
Molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,003
Carbonato de cálcio CaCO_3	29,290
Fosfato de cálcio CaHPO_4	0,430
Sulfato cúprico CuSO_4	0,516
Citrato férrico $\text{Fe}^{+3} + (\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	0,620
Sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,980
Sulfato de manganês $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,121
Iodeto de potássio KI	0,0005
Fosfato de potássio K_2HPO_4	34,310
Cloreto de sódio NaCl	25,060
Selenito de sódio Na_2SeO_3	0,002
Cloreto de zinco ZnCl_2	0,020
Fonte: ROGERS E HARPER, 1965	

QUADRO 8 Composição (mg/kg) da mistura vitamínica utilizada nas dietas

Componentes	mg
Vitamina A (concentrado 200.000 unidades/g)	4.500
Vitamina D (concentrado 400.000 unidades/g)	250
α -Tocoferol	5.000
Ácido ascórbico	45.00
Inositol	5.000
Cloreto de colina	75.000
Menadiona	2.250
Ácido p-aminobenzóico	5.000
Niacina	4.500
Riboflavina	1.000
Cloridrato de piridoxina	1.000
Cloridrato de tiamina	1.000
Pantotenato de cálcio	3.000
Biotina	20
Ácido fólico	90
Vitamina B ₁₂	1,35
Sacarose	para 1.000.000

Fonte: NBC, 1977/78

caseína, sendo que, o ensaio III foi com as frações suplementadas com o primeiro e segundo aminoácido limitante, mas sem autoclavagem; no ensaio IV, as frações foram autoclavadas e suplementadas antes do preparo das dietas. Nos Quadros 7, 8 e 9 são mostradas as composições das dietas dos quatro diferentes ensaios. Nos quatro ensaios, os índices calculados foram: quociente de eficiência das dietas, digestibilidade aparente, valor biológico e utilização líquida da proteína.

3.2.4.4. Cálculo do quociente de eficiência da dieta

Foi feito dividindo o ganho de peso pelo consumo de dieta.

3.2.4.5. Cálculo da digestibilidade

O cálculo foi feito baseando-se nas determinações do nitrogênio total ingerido e o eliminado nas fezes.

$$D_A\% = \frac{\text{N absorvido}}{\text{N ingerido}} \times 100 = \frac{I - F}{I} \times 100$$

Onde:

I = nitrogênio total ingerido com a dieta

F = nitrogênio total eliminado nas fezes

DA% = digestibilidade aparente

QUADRO 7. Composição da dieta do ensaio I em g/100g de dieta

Componentes	Dieta					
	(C)	(C)+FR0	(C)+FR2	(C)+FR3	(C)+FR4	(C)+FR5
Caseína (C)	24,5 [19,9]	24,5 [19,9]	24,5 [19,9]	24,5 [19,9]	24,5 [19,9]	24,5 [19,9]
Óleo	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Minerais	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Vitaminas	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Fibra	2,0		2,0	2,0		2,0
FR0		3,0 [0,14]				
FR2			3,0 [2,4]			
FR3				3,0 [1,5]		
FR4					3,0 [0,18]	
FR5						3,0 [1,6]
Carboidrato	*	*	*	*	*	*

* Para 100. Composto de 25% de açúcar comercial e 75% de amido de milho.

Cada fração contribuiu com 3% (p/p) em cada dieta.

Em colchetes é indicada a contribuição de cada fração no total de $\approx$ 20% de proteína da dieta.

QUADRO 8. Composição da dieta do ensaio II em g/100g de dieta

Componentes	Diets							
	(C)	(C) + FR0	(C) + FR1	(C) + FR2	(C) + FR3	(C) + FR4	(C) + FR5	(C) + FI
Caseína (C)	12,5 [10,2]	12,2 [9,9]	11,0 [8,9]	7,5 [6,1]	9,3 [7,6]	12,0 [9,75]	9,0 [7,3]	6,3 [5,1]
Óleo	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Minerais	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Vitaminas	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Fibra	2,0		2,0	2,0	2,0		2,0	
FR0		5,0 [0,24]						
FR1			5,0 [1,2]					
FR2				5,0 [4,0]				
FR3					5,0 [2,56]			
FR4						5,0 [0,31]		
FR5							5,0 [2,8]	
FI**								25,0 [5,0]
Carboidrato	x	x	x	x	x	x	x	x

Cada fração contribuiu com 5% (p/p) em cada dieta.

** FI = feijão integral. Em colchetes é indicada a contribuição de cada fração no total de 10% de proteína

* Para 100. Composto de 25% de açúcar refinado comercial e 75% de amido de milho.

QUADRO 9. Composição da dieta do ensaio III e IV em g/100g de dieta

Componentes	Dieta						
	(C)	(C)+FR0	(C)+FR1	(C)+FR2	(C)+FR3	(C)+FR4	(C)+FR5
Caseína (C)	12,5 [10,2]	12,0 [9,75]	10,0 [8,13]	4,5 [3,7]	7,5 [6,1]	12,0 [9,75]	7,0 [5,68]
Óleo	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Minerais	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Vitaminas	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Fibra	2,0		2,0	2,0	2,0		2,0
FR0		8,0 [0,36]					
FR1			8,0 [1,84]				
FR2				8,0 [6,5]			
FR3					8,0 [4,1]		
FR4						8,0 [0,49]	
FR5							8,0 [4,4]
Carboidrato	*	*	*	*	*	*	*

* Para 100. Composto de 25% de açúcar comercial e 75% de amido de milho.
Cada fração contribuiu com 8% (p/p) em cada dieta.
Em colchetes é indicada a contribuição de cada fração no total de 10% de proteína da dieta.

3.2.4.6. Cálculo do valor biológico

O valor biológico foi calculado pela relação:

$$VB_A\% = \frac{\text{N retido}}{\text{N absorvido}} \times 100 = \frac{I - F - U}{I - F} \times 100$$

Onde:

U = nitrogênio total urinário

VB_A% = valor biológico aparente

3.2.4.7. Cálculo da utilização líquida da proteína

Esses balanços de nitrogênio permitiram também o cálculo da utilização líquida da proteína pela relação:

$$NPU_A\% = \frac{\text{N retido}}{\text{N ingerido}} \times 100 = \frac{I - F - U}{I} \times 100$$

Onde:

NPU_A% = utilização líquida da proteína.

3.2.5. Análise estatística

O tratamento estatístico aplicado nos ensaios biológicos foi a análise de variância com dois critérios de variação, com posterior aplicação do teste de Duncan; seguindo as descrições de PIMENTEL GOMES, 1982.

IV. RESULTADOS

4.1.1. Análise centesimal da farinha de feijão integral

A composição centesimal do Carioca 80, em base seca, foi: proteína 23,41%, matéria graxa 1,45%, carboidrato 65,92%, cinza 4,22% e fibra bruta 5,0%. Carboidrato calculado por diferença: $\{ 100 - (\text{proteína} + \text{lipídio} + \text{cinza} + \text{fibra bruta}) \}$.

4.1.2. Composição em ácidos graxos do extrato etéreo

A composição em ácidos graxos da fração lipídica extraída do feijão Carioca 80 está apresentada no Quadro 10. Os resultados obtidos assemelham-se àqueles relatados por PATTE, *et alii*, para "pinto bean" e "kidney bean". Todavia, o Carioca 80 apresentou teores mais elevados dos ácidos esteárico e oléico, enquanto que, o teor de ácido linolênico foi em média 17% inferior aos teores reportados na literatura. PATTE *et alii*, 1982, sugeriram o uso dos teores dos ácidos graxos na verificação do parentesco genético entre leguminosas.

QUADRO 10. Composição em ácidos graxos livres do óleo de feijão Carioca 80

Componentes	Teor (%)
Palmítico	14,10
Estearico	1,80
Total saturados	15,90
Oléico	13,62
Linoléico	28,20
Linolênico	41,51
Total insaturados	83,33

4.1.3. Composição em aminoácidos

No Quadro 11 é apresentada a composição em aminoácidos do feijão integral (FI), frações (FRO-FR5) e caseína. Os valores encontrados estão em concordância com outros pesquisadores, PEACE, *et alii*, 1988; KANAMORI *et alii*, 1982, entre outros, os quais verificaram elevado teor de lisina, e quantidades limitantes de aminoácidos sulfurados. De maneira semelhante ao feijão "Great northern" estudado por PUSZTAI *et alii*, 1979, o Carioca 80 contém um teor relativamente alto de lisina e dos ácidos aspártico e

QUADRO 11. Composição em aminoácidos do material utilizado nas rações em gramas de aminoácidos /16 gramas de Nitrogênio

Aminoácido	A m o s t r a s							
	FR0	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	FI	CAS
Asp	10,83	9,36	11,55	13,24	9,97	12,92	15,93	6,54
Thr	4,61	2,21	4,41	8,23	4,21	3,75	6,24	4,24
Ser	6,35	4,53	5,75	8,72	4,64	6,93	6,19	5,87
Glu	11,38	20,93	17,30	13,03	11,34	18,33	16,75	20,21
Pro	5,49	7,57	4,13	4,55	3,98	3,32	5,36	10,00
Gly	10,29	2,33	3,75	4,56	4,00	3,44	4,76	2,51
Ala	5,83	3,88	4,44	6,71	5,88	4,11	7,37	2,73
1/2 Cys	0,21	0,46	0,49	3,66	0,41	0,72	0,50	0,40
Val	6,43	3,52	5,05	5,45	5,08	5,12	6,58	6,51
Met	2,04	0,74	1,40	0,84	0,59	1,78	1,49	2,68
Ile	4,55	3,18	5,23	4,65	4,46	4,75	4,99	5,62
Leu	7,00	5,26	10,75	8,33	8,17	10,32	6,81	8,29
Tyr	2,26	1,94	5,01	3,82	1,91	3,37	2,91	5,63
Phe	4,57	3,30	7,72	5,75	4,17	8,08	6,83	4,55
His	3,21	2,15	3,15	2,65	1,69	2,86	4,26	2,80
Lys	7,18	4,20	8,30	6,88	6,80	8,83	9,83	7,35
Amônia	1,60	2,42	1,51	1,49	1,14	1,53	0,99	2,22
Arg	5,91	8,17	6,46	1,94	4,69	6,43	7,47	3,56
Trp	#	1,14	0,74	0,58	0,50	0,88	0,97	1,25

FR0 = casca; FR1 = fração dializável + água de maceração; FR2 = globulinas que precipitam após a extração aquosa; FR3 = albuminas; FR4 = resíduo final após extração salina; FR5 = globulinas da extração salina; FI = farinha de feijão integral. CAS = caseína. # valor não colocado devido a problemas analíticos.

glutâmico sendo ligeiramente deficiente em leucina. Na farinha integral o triptofano correspondeu ao padrão FAO/WHO 1973, enquanto que treonina, valina e os aminoácidos aromáticos ultrapassaram os níveis deste padrão. Segundo PUSZTAI *et alii*, 1979; SGARBIERI, ANTUNES E ALMEIDA, 1979; KANAMORI *et alii*, 1982, os aminoácidos treonina, valina e isoleucina tendem a ser deficientes em algumas variedades de feijão, porém, no caso do Carioca 80 esses três aminoácidos apresentaram-se em quantidades adequadas.

Segundo JOHNSON E LAY, 1974, a proporção relativa de albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas na semente das leguminosas é um dos fatores que determina a qualidade nutricional do total da proteína, por que cada fração contém diferente composição em aminoácidos. Esses mesmos autores sugerem que o alto teor de lisina nas leguminosas pode ser atribuído à alta proporção de globulinas e ao baixo conteúdo de prolaminas. A relação leucina/isoleucina foi um pouco maior que a recomendada pela FAO/WHO, 1973, para uma proteína hipotética de boa qualidade.

Entre as frações estudadas, a fração albumina (FR3), apresentou o conteúdo mais elevado de aminoácidos sulfurados. Aqui cabe a mesma explicação que SGARBIERI, ANTUNES E JUNQUEIRA, 1982, deram para esse fato, observado por eles no feijão Rosinha G2; o alto teor de sulfurados é devido à presença na fração FR3 de maior concentração de inibidores de tripsina que apresentam conteúdo muito elevado de cistina na molécula e carecem de valina e triptofano. A fração FR3 no Carioca 80 apresentou-se com um teor de cistina marcadamente superior às outras frações, além de possuir a maior atividade de inibidor de tripsina. (Quadro 13). Seguindo a linha de raciocínio destes autores a FR3 devia, além de ser alta em cistina ser baixa em valina e triptofano, já que esses inibidores não contêm valina nem triptofano, porém, isso apenas é verdadeiro no caso do triptofano (baixo teor na FR3), enquanto que a valina apresenta-se em quantidades adequadas nas albuminas tanto do Carioca 80 quanto do Rosinha G2.

No Quadro 12 são apresentados os resultados da composição em aminoácidos livres do feijão integral e das frações FR0-FR5. A FR1 (fração dializável + água de maceração) apresentou-se com o maior conteúdo de aminoácidos livres (0,67%) destacando-se entre esses os ácidos aspártico, glutâmico e γ -aminobutírico, além da arginina.

QUADRO 12. Concentração de aminoácidos livres nas várias frações obtidas do feijão Carioca 80 (mg./100 g de amostra)

Aminoácido	A m o s t r a s						
	FR0	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	FI
DL-o-fosforina	0,46	2,56	0,43	2,02		0,72	0,43
Taurina			2,16				
O-fosfoetanolamina	2,97	25,14		4,38			5,21
Aspártico		69,84	1,40	8,15	0,84	0,61	18,78
Hidroxiprolina	0,34						
Treonina	0,25	16,80	0,46	0,32	0,14	0,46	0,64
Serina	0,40	6,80	0,34	0,36	0,11	1,03	0,81
Asparagina		46,30		6,90			
Ác. Glutâmico	2,80	81,50	3,75	5,78	1,46	7,60	
Glutamina	2,80	46,60		10,34			7,69
Ác. α aminoadípico	1,45	45,16		1,61	1,30	2,78	0,68
Prolina	0,23	13,64	0,64	0,54			
Glicina	0,25	13,73	0,32	0,57	0,12	1,07	0,58
Alanina	0,90	33,54	1,22		0,34	2,20	1,30
Citrulina		5,00			0,20		
Ác. α aminobutírico		1,57	0,40				
Valina	0,25	17,47	0,57			0,65	0,82
1/2 cistina		32,37	1,15			2,07	2,85
Metionina	0,27	2,75	0,14	1,37	0,31	0,29	1,31
DL-cistationa		0,33					
Ileucina	0,10	6,56	3,43	0,44		0,39	0,27
Leucina	0,21	12,24	0,20	0,44	0,26	0,80	0,21
Tirosina	0,22	8,32	0,64	0,46	0,34	0,81	0,25
Fenilalanina	0,17	11,34	0,34			0,26	0,98
Ác. γ -aminobutírico	1,29	70,80	1,38	3,14	0,82	11,41	1,18
Amônia	0,34	4,50	0,17	0,48	0,12	0,56	0,20
Ornitina	0,25	5,10	0,36	0,67	0,11	0,81	0,35
Lisina	0,26	8,28	0,45	0,70	0,41	0,70	0,28
Histidina	0,31	13,70	0,44	1,03	0,33	0,57	1,17
Arginina	3,78	65,58			4,11		11,03
Σ (% da amostra)	0,02	0,67	0,02	0,05	0,01	0,04	0,06

4.1.4. Balanço de materiais, contribuição de globulinas e albuminas para a proteína total

Na Figura 2 é apresentado o balanço de materiais do esquema de fracionamento utilizado. A casca, no Carioca 80, representou 11,1% em relação ao grão integral. As determinações de nitrogênio indicaram que este encontra-se localizado principalmente nos cotilédones do feijão com pequenas quantidades na fração FRO (casca) o que concorda com estudos de ELIAS, FERNÁNDEZ E BRESSANI, 1979, efetuados em outros cultivares de *Phaseolus vulgaris*. A fração albumina, FR3, representou quase 35% do nitrogênio total, enquanto que, a fração globulina FR2 + FR5, 42%. A soma de albuminas e globulinas atingiu 77% do nitrogênio total.

4.2.0. Caracterização parcial, química e bioquímica, de diferentes frações de feijão *Phaseolus vulgaris*, L., c.v. Carioca 80

No Quadro 13 é apresentada a caracterização parcial, química e bioquímica, de diferentes frações de feijão *Phaseolus vulgaris*, L. cultivar Carioca 80, comparadas com o feijão integral. FRO foi 4,5 vezes mais rica em compostos fenólicos que o feijão integral (C-80). A segunda fração mais rica em fenólicos foi FR1, a qual também continha a mesma atividade hemaglutinante e teor de

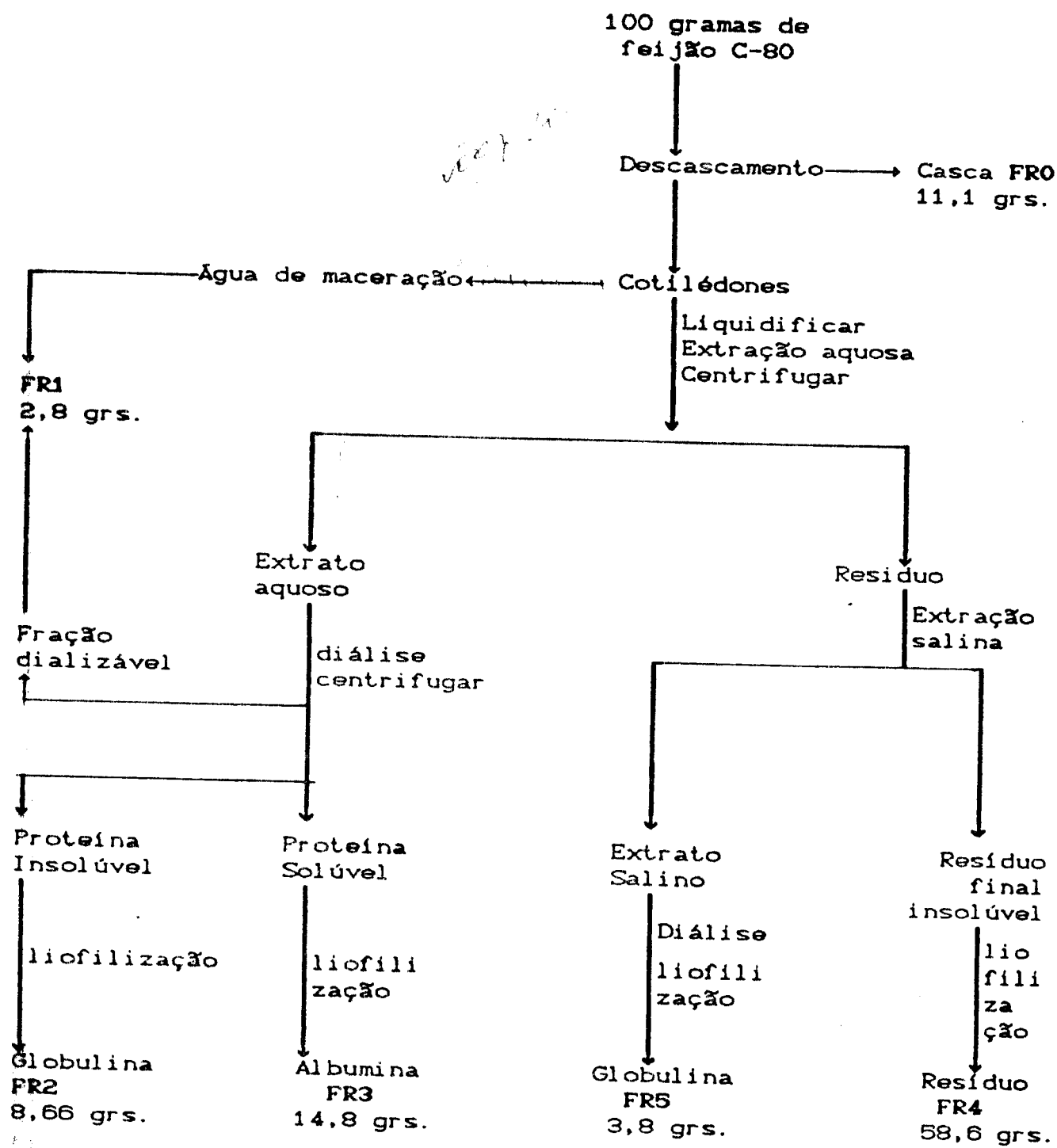


FIGURA 2. Balanço de materiais no fracionamento do feijão C-80

QUADRO 13. Caracterização parcial, química e bioquímica de diferentes frações de feijão *Phaseolus vulgaris*, L. cultivar Carioca 80.

Amostra ana- liza- da	Carboidrato total (%)	Proteína bruta (%Nx6,25)	Taninos (%)	Atividade aglutinante (U.H./g de amostra) X 10 ⁻²	Atividade antitripsina (UTI/g de amostra) X 10 ⁻³	Digestibi- lidade in vitro %
C 80	65,9	21,4	0,65	128,0	18,6	39,1
FR0	ND	4,5	2,93	ND*	15,2	19,9
FR1	44,5	23,0	0,80	128,0	8,6	28,8
FR2	8,8	81,6	0,26	256,0	17,4	65,8
FR3	25,2	50,8	0,32	2560,0	109,4	58,0
FR4	79,8	6,1	0,40	16,0	5,2	40,6
FR5	11,6	55,3	0,20	409,6	14,9	64,6

U.H. = unidade hemaglutinante; UTI = unidade de tripsina inibida; C 80 = Carioca 80; FR0-FR5 = frações obtidas como mostrado no esquema da Figura 1.
ND* = não detectado; ND = não determinado.

nitrogênio que o feijão integral, no entanto, muitos destes compostos nitrogenados nesta fração são de natureza não protéica e de baixo peso molecular. Esta fração foi também alta em carboidratos totais. Entre as frações protéicas, FR2 continha a menor concentração de carboidratos (8,8%) e a mais alta concentração de proteína (81,6%), enquanto que, FR3 continha 25,2% de carboidrato e teores menores de proteína (50,8%). FR5 apresentou valores intermediários para carboidratos (11,6%) e para proteínas (55,3%). Com respeito aos fatores antinutricionais, as proteínas hidrossolúveis (FR3) apresentaram as maiores atividades hemaglutinantes e de inibidor de tripsina, bem como, o maior conteúdo em fenólicos das três frações protéicas. Uma atividade hemaglutinante razoavelmente alta também foi encontrada em FR2 e FR5, as duas frações solúveis em soluções salinas.

No Quadro 14 são feitas algumas comparações de fatores antinutricionais entre uma dieta contendo carioca 80 cru como única fonte protéica (10%) e combinações de caseína mais 5 ou 8% das frações obtidas no esquema de fracionamento da Figura 1 (FR0-FR5). As dietas contendo FR0, FR1, FR2, FR4 ou FR5 são baixas em fenólicos e têm muito menor atividade antitriptica e hemaglutinante do que as dietas preparadas com feijão cru como única fonte de proteína. A dieta contendo FR3 apresenta claramente maior atividade antitriptica e muito maior atividade hemaglutinante do que

QUADRO 14. Conteúdo de alguns fatores antinutricionais em dietas com 10% de proteína provida por caseína e várias frações (FR0-FR5). Comparações feitas com uma dieta com 10% de proteína, na qual, feijão cru (cv. Carioca 80) é usado como única fonte protéica.

Fonte de proteína da dieta	Fenólicos totais (mg/100g dieta)	Atividade de inibidor de tripsina (UTI/100g dieta) $\times 10^{-3}$	Atividade hemaglutinante (UH/100g dieta) $\times 10^{-2}$
Carioca 80	303,5	868,6	5977,6
Caseína + 5% FR0	146,5	76,0	ND*
Caseína + 5% FR1	39,8	43,0	640,0
Caseína + 5% FR2	12,9	87,0	1280,0
Caseína + 5% FR3	16,1	547,0	12800,0
Caseína + 5% FR4	20,8	26,0	79,9
Caseína + 5% FR5	9,9	74,5	2048,0
Caseína + 25% FI	151,8	434,3	2988,8
Caseína + 8% FR0	234,4	121,6	ND*
Caseína + 8% FR1	64,0	63,8	1024,0
Caseína + 8% FR2	20,8	139,2	2048,0
Caseína + 8% FR3	25,6	875,2	20480,0
Caseína + 8% FR4	32,0	41,6	128,0
Caseína + 8% FR5	16,0	160,8	3276,8

ND* = Não detectado; FI = Feijão integral C-80; FR0-FR5 = Frações obtidas de acordo com o esquema de fracionamento da Figura 1.

as dietas preparadas com feijão cru como única fonte protéica. As dietas contendo FRO foram razoavelmente altas em fenólicos, enquanto que, as dietas com FR2 e FR5 mostraram considerável atividade hemaglutinante.

4.3.0. Balanço de nitrogênio dos ensaios I, II, III e IV

4.3.1. Ensaio I

No Quadro 15 são apresentados os resultados do ensaio I, balanço de nitrogênio no qual se utilizou 20% de proteína, oriunda de caseína, mais a proveniente de 3% de cada fração. Pode-se ver que as dietas que continham FR3 e FR5 foram as menos consumidas, seguidas de FR2, FR4 e FRO que foi igual à caseína. A digestibilidade foi menor na dieta com fração FR3 seguida de FR5, FR4, FR2 e FRO que foi igual à caseína. O valor biológico e NPU foram menores nas dietas com as frações FR2 e FR5.

4.3.2. Ensaio II

No Quadro 16 são apresentados os resultados do ensaio II, balanço de nitrogênio com dietas contendo 10% de proteína mais 5%

QUADRO 15. Resultados do ensaio I de balanço de nitrogênio usando 20% de proteína proveniente de caseína, mais 3% de cada fração. Os resultados representam a média do balanço (coleta de material) durante 120 horas.

Fonte protéica da dieta	Consumo de dieta (g)	Ganho de peso (g)	Quociente de eficiência da dieta	Balanço de nitrogênio (mg)				Da(%)	VBa(%)	NPUa(%)
				NI	NF	NU	NR			
Caseína (C)	57,3a	22,5a	0,39a	1800,0	148,8	522,1	1120,2	91,8a	68,8ab	63,0a
	±2,5	±8,0	±0,14	±78,2	±31,0	±121,4	±82,4	±1,4	±6,5	±6,8
(C) + FR0	57,3a	22,5a	0,39a	1798,0	167,3	508,3	1110,5	90,7a	68,8ab	62,4a
	±2,1	±2,7	±0,07	±54,3	±14,4	±96,6	±108,9	±0,7	±5,8	±5,6
(C) + FR2	54,5ab	19,2a	0,35a	1744,9	173,8	611,7	959,5	90,0ab	60,8b	54,8b
	±5,1	±2,8	±0,07	±162,5	±22,3	±18,3	±129,0	±0,7	±2,7	±2,6
(C) + FR3	48,1bc	22,5a	0,47a	1833,3	268,8	314,3	1050,2	82,9c	76,6a	63,8a
	±7,1	±7,7	±0,13	±241,7	±32,9	±56,9	±237,2	±4,6	±4,5	±6,3
(C) + FR4	58,9ab	24,4a	0,43a	1718,8	206,5	440,0	1072,3	87,6abc	71,5a	62,5a
	±5,3	±1,7	±0,02	±161,4	±58,1	±133,6	±116,5	±4,8	±5,8	±4,3
(C) + FR5	45,4c	22,3a	0,49a	1478,3	204,8	433,5	838,0	86,0bc	68,2b	58,8ab
	±6,4	±3,3	±0,10	±208,2	±46,4	±91,2	±113,9	±2,9	±4,1	±2,4

FR0-FR5: Frações obtidas de acordo ao esquema da Figura 1. Os valores identificados com as mesmas letras, nas colunas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade. Neste ensaio, foram utilizados três ratos por tratamento. NI = nitrogênio ingerido; NF = nitrogênio fecal; NU = nitrogênio urinário; NR = nitrogênio retido; Da = digestibilidade aparente; VBa = valor biológico aparente; NPUa = utilização líquida aparente da proteína; QED = quociente de eficiência da dieta (ganho de peso/consumo de dieta). Os valores ± são os desvios padrões.

QUADRO 16. Resultados do ensaio II de balanço de nitrogênio usando 10% de proteína proveniente caseína, mais 5% de cada fração. Os resultados representam a média do balanço (coleta de material) durante 120 horas.

Fonte protéica da dieta	Consumo de dieta (g)	Ganho de peso (g)	Quociente de eficiência da dieta	Balanço de nitrogênio (mg)				Da%O	VBa%O	NPUa%O
				NI	NF	NU	NR			
Caseína (C)	52,1a	17,0a	0,33ab	898,8	72,3	219,2	605,1	91,9a	73,5b	67,7bc
	±5,8	±1,2	±0,05	±99,8	±10,3	±37,8	±56,6	±0,5	±2,2	±2,3
(C) + FR0	57,1a	18,8a	0,33ab	908,3	115,0	169,9	623,4	87,3ab	78,9ab	68,9ab
	±5,0	±1,8	±0,03	±78,8	±14,6	±47,3	±28,5	±1,2	±4,4	±3,6
(C) + FR1	36,9b	8,9b	0,24b	597,4	95,4	129,1	372,9	84,0b	74,1b	62,2c
	±2,5	±1,7	±0,04	±40,2	±4,7	±7,7	±45,7	±1,1	±3,3	±3,5
(C) + FR2	34,0bc	0,5cd	0,01c	564,4	153,8	215,4	195,3	72,9c	47,5c	34,5e
	±3,3	±3,1	±0,11	±54,3	±30,8	±24,9	±27,4	±3,8	±4,4	±2,5
(C) + FR3	31,3bc	2,8c	0,09c	545,9	190,2	90,4	265,4	65,4d	74,6b	48,7d
	±1,4	±2,1	±0,07	±24,1	±33,9	±22,9	±27,9	±4,9	±6,5	±5,6
(C) + FR4	54,9a	19,8a	0,36a	921,9	91,4	144,5	685,9	90,1ab	82,5a	74,3a
	±4,5	±2,6	±0,04	±75,9	±7,4	±8,1	±69,8	±0,9	±1,5	±2,0
(C) + FR5	29,8c	-1,5d	-0,05c	474,4	130,3	224,5	119,6	72,4c	34,6d	25,2f
	±1,5	±2,5	±0,11	±24,6	±13,3	±25,4	±22,5	±3,7	±5,3	±4,7
(C) + 25% FI	32,1bc	-1,9d	-0,06c	555,8	229,4	212,3	116,6	58,7e	34,9d	20,5f
	±2,5	±3,2	±0,11	±43,4	±45,8	±20,1	±35,9	±7,9	±5,8	±6,0

FR0-FR5: Frações obtidas de acordo ao esquema da Figura 1. Os valores identificados com as mesmas letras, nas colunas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade. Neste ensaio, foram utilizados quatro ratos por tratamento. NI = nitrogênio ingerido; NF = nitrogênio fecal; NU = nitrogênio urinário; Da = digestibilidade aparente; VBa = valor biológico aparente; NPUa = utilização líquida aparente da proteína; QED = quociente de eficiência da dieta (ganho de peso/consumo de dieta)

de cada uma das frações (FR0, FR1, FR2, FR3, FR4 e FR5) sendo que essas dietas permaneceram isoprotéicas às expensas da caseína. As comparações são feitas entre uma dieta com 10% de caseína e dietas contendo 5% de cada uma das frações. A esse nível de adição FR0 e FR4 não afetaram significativamente a eficiência da ração nem a utilização protéica. As frações FR2, FR3 e FR5 causaram um significativo decréscimo na eficiência da ração e na absorção e utilização protéica. A fração FR1 diminuiu a eficiência da ração e a digestibilidade, afetando também significativamente o valor biológico (VB_A) e a utilização líquida da proteína (NPU_A). Neste ensaio a fração FR5 foi a que mais interferiu com o aproveitamento biológico da caseína seguido pela fração FR2 e FR3 a despeito do fato desta última fração ter apresentado a maior concentração de fatores antinutricionais (Quadro 13). Neste mesmo ensaio foi dada a um grupo de ratos uma dieta com 25% de farinha de feijão cru (5% de proteína de feijão + 5% de proteína de caseína). Essa dieta foi a que apresentou os piores índices em relação ao aproveitamento biológico das proteínas da dieta.

4.3.3. Ensaio III

No Quadro 17 apresentam-se os resultados de balanço de nitrogênio do ensaio III onde as frações entraram na dieta a um nível de 8%, porém, sendo suplementadas com o primeiro e segundo aminoácido limitante ao nível da caseína. A eficiência da ração

QUADRO 17. Resultados do ensaio III de balanço de nitrogênio usando 10% de proteína proveniente de caseína, mais 8% de cada fração. Os resultados representam a média do balanço (coleta de material) durante 120 horas; as dietas foram suplementadas com o 1º e 2º aminoácido limitante.

Fonte proteica da dieta	Consumo de dieta (g)	Ganho de peso (g)	Quociente de eficiência da dieta	Balanço de nitrogênio (mg)				DA(X)	VBA(X)	NPUA(X)
				NI	NF	NU	NR			
Caseína (C)	47,7a ±3,0	24,8a ±7,4	0,52a ±0,21	801,4 ±50,8	79,5 ±9,3	148,6 ±24,3	578,1 ±62,1	90,1a ±1,5	79,7a ±3,8	71,8a ±4,5
(C) + FR0	51,5a ±9,6	14,8b ±0,9	0,29bc ±0,04	885,8 ±165,1	171,2 ±42,2	182,5 ±43,1	552,8 ±99,9	80,7b ±3,6	77,3a ±3,0	62,3b ±5,11
(C) + FR1	27,3cd ±6,4	5,4c ±1,6	0,21c ±0,09	464,1 ±108,7	119,5 ±26,2	154,5 ±28,4	193,4 ±70,8	74,3c ±4,6	55,2b ±6,5	40,9c ±6,7
(C) + FR2	33,0bc ±10,3	-0,8d ±1,8	-0,05d ±0,10	557,7 ±173,6	213,6 ±51,0	201,2 ±71,1	136,7 ±51,7	59,8d ±5,7	39,7c ±2,3	23,7d ±3,1
(C) + FR3	21,5d ±1,1	-0,5d ±1,5	-0,02d ±0,05	358,9 ±17,9	198,0 ±11,7	110,7 ±15,7	51,4 ±13,9	45,1e ±5,9	31,2d ±2,6	14,1e ±3,1
(C) + FR4	41,5ab ±5,3	14,8b ±1,7	0,38b ±0,02	701,4 ±90,1	77,9 ±15,9	142,4 ±22,0	481,9 ±64,0	88,9a ±4,1	77,2a ±2,1	68,6ab ±3,2
(C) + FR5	29,2c ±7,0	0,0d ±1,3	0,00d ±0,03	499,3 ±119,0	208,8 ±51,8	106,2 ±35,9	96,3 ±38,1	58,6d ±4,1	32,9d ±5,0	19,3de ±3,1

FR0-FR5: Frações obtidas de acordo ao esquema da Figura 1. Os valores identificados com as mesmas letras, nas colunas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados, representam a média de 4 ratos/3 dias. NI = nitrogênio ingerido; NF = nitrogênio fecal; NU = nitrogênio urinário; NR = nitrogênio retido; DA = digestibilidade aparente; VBA = valor biológico aparente; NPUA = utilização líquida aparente da proteína; QED = quociente de eficiência da dieta (ganho de peso/consumo de dieta). Os valores ± são os desvios padrões.

foi menor nas dietas com as frações FR3, FR2 e FR5, seguida de FR1, FR0 e FR4. FR0 não afetou significativamente o VBA, no entanto, diminuiu a DA e o NPUA. FR4 não afetou a utilização protéica, enquanto que, FR2, FR3 e FR5 afetaram marcadamente a utilização biológica da proteína; fração FR1 ficou numa posição intermediária. A suplementação com os aminoácidos limitantes contrabalançou, em parte, o efeito antinutricional da fração FR5, mas, não o efeito das frações FR2 e FR3. A fração FR3 conferiu à proteína da dieta a mais baixa digestibilidade e o mais baixo índice de utilização biológica. O escore químico destas dietas antes da suplementação é apresentado no Quadro 18.

4.3.4. Ensaio IV

No Quadro 19 são mostrados os resultados de balanço de nitrogênio das dietas com 8% de cada uma das frações, autoclavadas e suplementadas com o primeiro e segundo aminoácido limitante. Com esse tratamento todos os fatores antinutricionais termolábeis foram destruídos e os fatores antinutricionais remanescentes devem ser atribuídos à presença de compostos estáveis ao calor nas frações de feijão ou ao efeito do calor sob a destruição e/ou decréscimo na biodisponibilidade de aminoácidos essenciais do feijão, ou quiçá, o efeito combinado da presença de substâncias antinutricionais estáveis ao calor e o decréscimo na biodisponibilidade devido ao tratamento térmico.

QUADRO 18. Escore químico de dietas contendo caseína e diferentes frações de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) cv. Carioca 80. A comparação é feita com a dieta controle (10% de caseína); os 10% de proteína são mantidos na dieta após a adição de cada fração às expensas da caseína.

Aminoácido	Escore de aminoácidos das dietas com várias fontes proteicas					
	Cas + FR0	Cas + FR1	Cas + FR2	Cas + FR3	Cas + FR4	Cas + FR5
Lys	0,99	0,92	1,10	0,97	0,99	1,10
Met + Cys	0,98	0,88	0,75	1,20	0,98	0,92
Thr	1,00	0,91	1,00	1,40	1,00	0,95
Trp	1,00	0,98	0,73	0,78	0,97	0,87
Arg	1,00	1,20	1,50	0,81	1,00	1,35
Phe + Tyr	0,98	0,91	1,20	0,97	0,98	1,10
Val	0,99	0,91	0,85	0,93	0,99	0,90
Ile	0,99	0,92	0,95	0,93	0,99	0,93
Leu	0,99	0,93	1,20	1,00	0,99	1,10
His	1,00	0,93	1,20	1,00	0,99	1,10

As diferentes frações FR0-FR5 contribuíam com 8% (p/p) nas dietas.

QUADRO 19. Resultados do ensaio IV de balanço de nitrogênio usando 10% de proteína proveniente de caseína, mais 8% de cada fração. Os resultados representam a média do balanço (coleta de material) durante 120 horas; foram suplementadas com o 1º e 2º aminoácido limitante e autoclavadas 121°C, 30 min., 15 lb de pressão.

Fonte protéica da dieta	Consumo de dieta (g)	Ganho de peso (g)	Quociente de eficiência da dieta	Balanço de nitrogênio (mg)				DA(X)	VA(X)	NPUA(X)
				NI	NF	NU	NR			
Caseína (C)	47,7a ±3,0	24,8a ±7,4	0,52a ±0,21	801,4 ±50,8	79,5 ±9,3	146,8 ±24,3	576,1 ±62,1	90,1a ±1,5	70,7a ±3,8	71,8a ±4,5
(C) + FR0	51,0a ±8,2	15,2b ±4,1	0,30b ±0,07	887,4 ±142,1	158,8 ±31,6	150,0 ±48,9	575,5 ±82,4	82,1b ±1,0	70,2a ±4,4	65,1a ±4,5
(C) + FR1	48,0a ±4,6	14,3b ±1,8	0,30b ±0,05	782,4 ±74,7	188,8 ±44,8	188,0 ±12,2	428,0 ±41,2	78,7bc ±4,3	69,8b ±3,2	54,0bc ±1,6
(C) + FR2	41,5a ±4,7	7,8c ±1,2	0,19b ±0,01	684,8 ±77,7	122,5 ±10,9	167,8 ±8,1	394,5 ±64,2	82,1b ±1,9	70,2b ±2,4	57,8b ±3,0
(C) + FR3	46,8a ±2,9	10,0bc ±2,0	0,21b ±0,06	758,2 ±46,9	182,5 ±36,3	208,0 ±33,1	369,0 ±64,4	75,9c ±4,5	63,9c ±7,1	48,5c ±5,6
(C) + FR4	42,5a ±5,0	12,2bc ±1,6	0,29b ±0,03	722,5 ±85,0	83,8 ±26,7	139,2 ±23,8	400,5 ±76,0	88,0a ±4,1	78,2a ±3,0	69,1a ±5,2
(C) + FR5	49,2a ±5,5	10,2bc ±0,8	0,21b ±0,01	818,7 ±107,2	104,1 ±30,1	192,0 ±27,7	430,0 ±98,0	76,2c ±5,0	69,0b ±1,6	52,6bc ±4,6

FR0-FR5: Frações obtidas de acordo ao esquema da Figura 1. Os valores identificados com as mesmas letras, nas colunas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade. Neste ensaio, foram utilizados quatro ratos por tratamento. NI = nitrogênio ingerido; NF = nitrogênio fecal; NU = nitrogênio urinário; NR = nitrogênio retido; DA = digestibilidade aparente; VA = valor biológico aparente; NPUA = utilização líquida aparente da proteína; QED = quociente de eficiência da dieta (ganho de peso/consumo de dieta). Os valores ± são os desvios padrões.

Sob estas condições FR0 diminuiu a eficiência da dieta e a digestibilidade protéica, mas, não alterou significativamente VBA e NPUA. A fração FR4 diminuiu a eficiência da dieta, porém, a utilização protéica não foi afetada. Todas as outras frações FR1, FR2, FR3 e FR5 tiveram a eficiência da ração e a utilização protéica significativamente diminuída. O crescimento dos ratos foi mais afetado na presença de FR2 a qual foi deficiente em valina, além dos aminoácidos metionina e triptofano (Quadro 18). No entanto a utilização protéica foi menor na presença de FR3 a qual continha o maior teor de carboidrato e deve ter sido mais afetada por reações do tipo Maillard como resultado do tratamento térmico (SGARBIERI *et alii*, 1982).

V. DISCUSSÃO

Conforme revisões publicadas por MEINERS *et alii*, 1976; MORAES E ANGELUCCI, 1971; SGARBIERI E WHITAKER, 1982; DURIGAN, 1986 E KOEHLER, 1987, a composição centesimal do feijão Carioca 80 integral é bastante semelhante à de outros cultivares e variedades de *Phaseolus vulgaris* cultivados no Brasil e no exterior. Quantitativamente os componentes mais importantes são os carboidratos, principalmente amido, e as proteínas representadas, predominantemente, por globulinas e albuminas. A fração lipídica que não representa mais do que 1-3% em peso, base seca, é bastante insaturada com o ácido linolênico predominando sobre os demais. O perfil de ácidos graxos encontrado para o Carioca 80 é similar ao descrito por outros autores como PATTE *et alii*, 1982, para cultivares norte-americanos.

Quando as frações protéicas são isoladas e sua digestibilidade comparada com a da proteína do feijão integral verifica-se que a proteína isolada apresenta digestibilidade bem superior à da proteína do feijão integral (SGARBIERI, ANTUNES E JUNQUEIRA, 1982). Isso também foi verdadeiro no caso do feijão Carioca 80, no qual as frações isoladas apresentaram maior digestibilidade que o feijão integral.

A proteína de feijão tem-se revelado de baixo valor nutritivo por ser deficiente em aminoácidos sulfurados e em menor proporção triptofano. A digestibilidade é também inferior à maioria das proteínas de origem animal e muitas de origem vegetal (SGARBIERI E WHITAKER, 1981; SATHE, DESHPANDE E SALUNKE, 1984). Os dados obtidos neste trabalho confirmam este fato.

No ensaio I, o efeito das diferentes frações sob a utilização protéica e a eficiência da dieta foi mascarado pelo elevado teor de caseína nas dietas. A partir do ensaio II, no qual, as dietas passaram a conter apenas 10% de proteína o efeito das frações sob a eficiência da dieta e a utilização da proteína foi mais pronunciado.

A fração FRO (casca ou tegumento) continha 2,93% de tanino e quando adicionada à dieta com 10% de proteína, na proporção de 8%, produziu uma diminuição no ganho de peso e no quociente de eficiência da dieta de 40,3 e 44,2 %, respectivamente. A presença de casca na dieta diminuiu também de maneira significativa ($P = 0,05$) a digestibilidade da proteína. Mesmo depois de autoclavada (121°C , 30 min, 15 Lb) o ganho de peso foi 38,7% e o quociente de eficiência da dieta 42,3% inferior à dieta com 10% de caseína. A digestibilidade da proteína continuou significativamente inferior ao da caseína ($P = 0,05$). Cumpre salientar

que tanto na dieta contendo a casca não autoclavada como na que continha a casca previamente autoclavada, a interferência da casca não pode ser atribuída ao desequilíbrio de aminoácidos na fração protéica desde que os aminoácidos limitantes foram adicionados na casca até se igualar ao nível da caseína. Mesmo sem adição, o escore de aminoácidos essenciais da proteína da dieta com casca (Quadro 18) não diferiu significativamente da dieta com caseína. A interferência da fração casca no crescimento dos ratos e na digestibilidade da proteína da dieta poderá ser atribuída em parte à elevada concentração de taninos nessa fração e, talvez à presença de outros fatores não identificados, aparentemente termo-resistentes, uma vez que a autoclavagem não eliminou o problema da interferência.

A vantagem da eliminação da casca do feijão Carioca 80 em relação aos índices de aproveitamento da proteína foi demonstrado por TESOTO E SGARBIERI, 1989. Neste trabalho a eliminação da casca melhorou a digestibilidade e o valor biológico da proteína em 14,0 e 11,0%, respectivamente.

A fração FR1 (sólidos solúveis da água de maceração e da água de diálise) contém, concentração relativamente elevada de fenólicos e ação hemaglutinante (Quadro 13). Contém 23% de substâncias nitrogenadas (N X 6,25), das quais 0,67% são amino-

ácidos não protéicos (Quadro 12). O escore químico dos aminoácidos essenciais da dieta contendo 8% desta fração, mantida a proteína total a 10% (Quadro 18), não diferiu substancialmente da dieta com 10% de caseína. A presença na dieta de 8% desta fração reduziu a ingestão de alimentos em 42,8%, o ganho de peso em 78,2%, o quociente de eficiência da dieta de 59,6%. A digestibilidade, o valor biológico e a utilização líquida da proteína diminuíram significativamente ($P = 0,05$), tendo caído para 82,4, 69,2 e 57,0% da caseína, respectivamente. Autoclavagem (121°C , 30 min, 15 Lb de pressão) diminuiu as diferenças porém não as eliminou. Apenas a ingestão de dieta se igualou à da dieta de caseína. O ganho de peso foi 57,7% e a eficiência da dieta 57,7% em relação à de caseína. Os índices de utilização de proteína foram $\text{DA} = 87,3\%$, $\text{VBA} = 87,6\%$ e $\text{NPUA} = 76,4\%$ em relação à caseína, valores estatisticamente inferiores ($P = 0,05$) aos da caseína. A influência negativa dos componentes da água de maceração do feijão Carioca 80 foi demonstrada indiretamente pela troca da água antes da cocção dos grãos (TESOTO E SGARBIERI, 1989).

A existência de substâncias antinutricionais, de baixo peso molecular e termorresistentes já havia sido mencionada por AW E SWANSON, 1985, para o feijão *black bean*. Substâncias com propriedades antinutricionais passíveis de estarem presentes nesta fração, além de inibidores proteolíticos de baixo peso molecular são: taninos, ácido fítico, glicosídeos cianogênicos, oligossacarídeos causadores de flatulência, dentre os já conhecidos.

As frações FR2, FR3 e FR5 são predominantemente proteínas. FR2 e FR5 são proteínas solúveis em soluções salinas (globulinas) e apresentam características de composição e de valor nutritivo semelhantes. A FR2 é mais limitante em aminoácidos sulfurados do que a FR5, sendo ainda ligeiramente limitante em valina (Quadro 18), quando comparadas com a caseína. Possui considerável atividade de inibidor de tripsina e hemaglutinante (Quadro 13). Apesar disto a digestibilidade *in vitro* da proteína nessas duas frações esteve ao redor de 65% (Quadro 13). Quando entraram na composição da dieta na proporção de 8%, mesmo com adição dos 1º e 2º aminoácidos limitantes ao nível da caseína, a interferência com a ingestão da dieta, crescimento dos ratos e com o quociente de eficiência das dietas foi muito pronunciada (Quadro 17). Os índices de utilização da proteína também foram muito insatisfatórios. Para a dieta contendo FR2 o consumo caiu para 69,2% em relação a de caseína. Os animais perderam peso e o quociente de eficiência da dieta foi de apenas 3,8%, comparado com o da caseína. Os valores de digestibilidade (DA%), valor biológico (VBA%) e utilização líquida da proteína (NPUA%) foram 66,4, 49,8 e 33,0% da caseína, respectivamente. Para a FR5 foram obtidos resultados muito semelhantes aos da FR2. Autoclavagem dessas frações praticamente eliminou o problema de consumo porém o ganho de peso e o quociente de eficiência da dieta continuaram deficientes, ou seja 31,4 e 41,1%, respectivamente para FR2 e FR5,

em relação à dieta de caseína. Os índices de DA, VBA e NPUA melhoraram consideravelmente com o tratamento térmico, porém ainda continuaram significativamente inferiores aos da caseína.

A fração FR3 (albuminas) é a que apresentou atividade mais elevada de hemaglutinação e de inibidor de tripsina (Quadro 13). Essa fração apresentou também uma concentração bastante elevada (25%) de carboidrato. Quando introduzida na dieta na proporção de 8%, afetou drasticamente o consumo de dieta (45%) e o quociente de eficiência da dieta (3,8%) da caseína, resultando em perda de peso dos animais. A DA%, VBA% e NPUA% foram os mais baixos de todos os tratamentos, respectivamente 50,0; 39,0 e 19,6% da caseína. A autoclavagem desta fração normalizou o consumo, tendo também elevado o ganho de peso, a eficiência da dieta e os índices de utilização biológica da proteína aos níveis de FR2 e FR5, mas permanecendo ainda significativamente inferior à caseína ($P = 0,05$, Quadros 17 e 19).

A fração FR4 (resíduo insolúvel) interferiu muito pouco com o consumo de dieta, porém o ganho de peso e o quociente de eficiência da dieta foram 59,7% e 69,2%, respectivamente, quando comparados com a dieta de caseína. Os índices de utilização biológica da proteína não diferiram dos da caseína. Esta fração deverá conter proteínas estruturais e do tipo glutelinas com um

bom equilíbrio aminoacídico, como evidencia o escore químico (Quadro 18), além disso apresenta níveis bastante baixos de fatores antinutricionais (Quadro 14). A autoclavagem de FR4 basicamente não melhorou o ganho de peso e a eficiência da dieta, não tendo afetado os índices de utilização biológica da proteína. Talvez o fator limitante da eficiência da dieta contendo FR4 tenha sido o elevado teor de fibra alimentar limitando o ganho de peso pelos ratos.

DURIGAN, 1986 e SGARBIERI, DURIGAN E ALMEIDA, 1987, demonstraram correlação positiva altamente significativa entre atividade hemaglutinante e toxicidade de vários cultivares de *Phaseolus*. OLIVEIRA E SGARBIERI, 1986, demonstraram que feijão cru ou proteína isolada de feijão cru, não desnaturada provoca perdas de nitrogênio corporal (endógeno) em ratos em até cinco vezes o ocasionado pela dieta controle de caseína e que mesmo dietas contendo feijão cozido ou proteínas isoladas de feijão e autoclavadas provocam perda de nitrogênio endógeno superior ao da dieta padrão de caseína. Por outro lado a autoclavagem (121°C, 15 min, 15 Lb pressão) provocou perda de biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e do PER, tanto em farinha integral de feijão Rosinha G2 como nas frações protéicas isoladas deste cultivar, quando o tratamento foi superior a 10 minutos (SGARBIERI, ANTUNES E JUNQUEIRA, 1982). É possível, portanto, que

a baixa recuperação do valor nutritivo das dietas contendo frações de feijão após suplementação com metionina e triptofano e tratamento térmico, tenha sido devida, em parte à perda da biodisponibilidade de aminoácidos e outros nutrientes essenciais (ação do calor) e também ao maior estímulo à perda de nitrogênio endógeno por constituintes da composição do feijão.

Recomenda-se, neste tipo de trabalho que: a) ao efetuar os ensaios biológicos seja utilizada albumina de ovo em lugar de caseína, já que, nesta última o aminoácido limitante é também a metionina. b) Ao descascar o feijão para posterior fracionamento, recomenda-se fazê-lo, por algum meio físico que não implique na utilização de maceração ou se utilizada, usar um solvente com baixa polaridade (exemplo n-heptano) que não permitiria a solubilização de compostos fenólicos rumo aos cotilédones. Com isto, ter-se-ia condições de minimizar as interações da proteína com os fenólicos.

VI. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho, permitem a conclusão de que a toxicidade e o efeito antinutritivo das várias frações obtidas pelo fracionamento do feijão Carioca 80 cru resultam da combinação de: 1) Presença nas várias frações de compostos termolábeis, os quais são tóxicos para o rato. 2) Presença nas frações, de substâncias antinutricionais termo-estáveis, como taninos as quais, diminuem a digestibilidade e a utilização de proteínas, pelo rato. 3) Deficiência de aminoácidos essenciais que tende a aumentar devido ao decréscimo na biodisponibilidade causado pelo tratamento térmico .

VI. BIBLIOGRAFIA

- AACC (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 7th. ed., Saint Paul, AACC, Vol. 1 e 2. 1969.
- ABSAR, N.; YAMASAKI, N. & FUMATSU, G.: Identification of the tryptophan residue located at the saccharide binding site of castor bean hemagglutinin. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 3071-3076, 1986.
- AKESON, W. R. & STAHMANN, M. A.: A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.*, 257-261, 1964.
- ALMQUIST, H. J.; CHRISTENSEN, H. L. & MAURER, S.: Sulphide liberation from raw soybean protein. *Proc. Soc. Exptl. Med. Biol.* 122: 913-914, 1966.
- ALLEN, L. W.; SVENSON, R. H. & YACHNIN, S.: Purification of mitogenic protein derived from *Phaseolus vulgaris*: Isolation of potent and weak phytohemagglutinin possessing mitogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 334-341, 1969.
- ALLISON, J. B.: The nutritive value of dietary proteins. In: Mummo, H. N. & Allison, J. B., ed., *Mammalian Protein Metabolism*. New York, Academic Press, V. 2., p. 45, 1964.
- AMAYA-FARFAN, J.; YOUNG, C. T. & CHICHESTER, C. O.: Automated determination of tryptophan in legumes and cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 25: 139-141, 1977.

- ANGHARAD, M. R.; GATEHOUSE, F. M. D.; DOVE, J.; FENTON, K. A. & PUSZTAI, A.: Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of larvae of *Callosobruchus maculatus*; mechanism of toxicity. J. Sci. Food Agric. 35: 373-380, 1984.
- AOCS (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY). Approved Methods of the American Oil Chemist's Society. AOCS, Ce 2-66, 1986.
- A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official methods of analysis. 12th ed., Washington D. C., 1975
- AUGUSTIN, J.; BECK, C. B.; KALBFLEISH, G.; KAGEL, L. C.; & MATTHEWS, R. H.: Variation in the vitamin and mineral content of raw and cooked commercial *Phaseolus vulgaris* classes. J. Food Sci., 46: 1701-1706, 1981.
- AW, T. L. & SWANSON, B. G.: Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. J. Food Sci., 50: 67-71, 1985.
- AYKROYD, W. R. & DOUGHTY, J.: Legumes in human nutrition. FAO Nutr. Studies 19: 1-38, 1964.
- BECKMAN INSTRUMENTS. Manual of analysis with the model 120 C amino acid analyzer. Stanford Park, Palo Alto, California, Spinco Division, Beckman Instruments Inc., 1977.
- BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M. J.: Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. Planta 142: 291-298, 1978.

- BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M. J.: The rough endoplasmic reticulum is the site of reserve-protein synthesis in developing cotyledons. *Planta* 146: 487-493, 1979.
- BOYD, W. C. & SHAPLEIGH, E.: Diagnosis of subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (lectins). *J. Lab. Clin Med.* 44: 235-252, 1954.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L. G.; WOLZAK, A.; HAGERMAN, A. E. & BUTLER, L. G.: Tannin in common beans: Methods of analysis and effects on the protein quality. *J. Food Sci.*, 48: 1000-1003, 1983.
- BULISANI, E. A.; DE ALMEIDA, L. D. & ROSTON, J.A.: A cultura do feijoeiro no estado de São Paulo. Em *Feijão Fatores de Produção e Qualidade*. Campinas, Fundação Cargill, 29-86, 1987.
- CURL, C. L.; PRICE, K. R. & FENWICK, G. R.: Isolation and structural elucidation of a new saponin (soyasaponin V) from haricot bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) *J. Sci. Food Agric.* 48: 101-107, 1988.
- DESPHANDE, S. S. & NIELSEN, S. S.: Nitrogenous constituents of selected grain legumes. *J. Food Sci.*, 52: 1321-1325, 1987a.
- DESPHANDE, S. S. & NIELSEN, S. S.: *In vitro* enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Food Sci.*, 52: 1326-1329, 1987b.
- DESPHANDE, S. S. & NIELSEN, S. S.: *In vitro* digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: The role of heat-stable protease inhibitors. *J. Food Sci.*, 52: 1330-1334, 1987c.

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356, 1956.
- DURIGAN, J. F.: Estudo da toxidez, composição e valor nutritivo das proteínas de cultivares brasileiros de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S. P., Brasil 1986.
- DURIGAN, J. F.; SGARBIERI, V. C. & ALMEIDA, L. D.: Antinutritional Factors and Toxicity in Raw Dry Beans. *J. Food Biochem.*, 11: 185-200, 1987.
- DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. & DE SOUZA, N.: In: potential of field beans and other food legumes in Latin America. CIAT SEMINAR N° 2E, 49-56, 1973.
- ELIAS, L. G.; FERNANDEZ, D. G. & BRESSANI, R.: Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. *J. Food Sci.*, 44: 524-527, 1979.
- FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO ad hoc expert committee on energy and protein requirements. World Health Org. Tech. Rep. Ser. No 522 Geneva. Food and Agric. Org. Rep. Ser. No. 53 Rome, 1973.
- F. A. O. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Monthly Bulletin of Statistics 6: may, p. 20, 1983 e 1987.

- FOLHA DE SÃO PAULO. Adeus ao Carioquinha. Suplemento "de olho na safra", ano 1 Nº 10 Agrofolha, 2 setembro editado em São Paulo, S. P., 1986.
- FRELS, J. M. & RUPNOW, J. H.: Characterization of two α -amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 50: 72-77, 1985.
- FRIEDMAN, M., ED. Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. New York, Marcel Dekker, v. 1, p. 1-2, 1975.
- GLICK, Z. & JOSLYN, M. A.: Food intake depression and other metabolic effects of tannic acid in the rat. J. Nutr., 100: 509-515, 1970a.
- GLICK, Z. & JOSLYN, M. A.: Effect of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat. J. Nutr., 100: 516-520, 1970b.
- GREER, F. M.: Local (intestinal) and systematic responses of animals to ingested *Phaseolus vulgaris* lectins. Mechanism of lectin toxicity. PhD thesis. Scotland, UK, 1983.
- HACKLER, L. R.: Methods of measuring protein quality: A review of bioassay procedures. Cereal Chem., 54: 984-985, 1978.
- HANG, Y. D.; STEINKRAUS, K. H. & HACKLER, L. R.: Amino acid composition of high protein fractions prepared from mung beans, pea beans, and red kidney beans. J. Food Sci. 45: 388-89, 1980.

- HIGUCHI, M.; TSUCHIYA, I. & IWAI, K.: Growth inhibition and small intestinal lesions in rats after feeding with isolated winged bean lectin. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 695-701, 1984
- HIGUCHI, M.; OHTAMI, Y. & IWAI, K.: Purification and characterization of the acidic lectin from winged bean seeds. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 1847-1853, 1986.
- ISHINO, K. & ORTEGA, M. L.: Fractionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 529-533, 1975.
- JAFFE, W. G. & BRUCHER, O.: Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 22: 267-281, 1973.
- JAFFE, W. G.; BRUCHER, O. & POLOZZO, A.: Detection of four types of specific phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Z. Immunitaetsforsch Exp. Klin. Immunol.*, 142: 439-447, 1972.
- JOHNSON, V. A. & LAY, C. L.: Genetic improvement of plants proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 22: 558-560, 1974.
- JOHNSON, I. T.; GEE, J. M.; PRICE, K. R.; CURL, C. L. & FENWICK, G. R.: Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *J. Nutr.* 116: 2270-2277, 1986.
- JONES, W. T.; BROADHURST, R. B. & LYTTLETON, J. W.: The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemistry* 15: 1407-1409, 1976.

- JUNQUEIRA, R. G. & SGARBIERI, V. C.: Isolation and general properties of lectin from the bean (*Phaseolus vulgaris*, L., var. Rosinha G2). J. Food Biochem., 5: 165-179, 1981.
- KADAM, S. S.; SMITHARD, R. R.; EYRE, M. D. & ARMSTRONG, D. G.: Effects of heat treatments on antinutritional factors and quality of proteins in winged bean. J. Sci. Food Agric., 39: 267-275, 1988.
- KAKADE, M. L.; SIMONS, N. R. & LIENER, I. E.: An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chem., 46: , 518-526, 1969.
- KANAMORI, M.; IKEUCHI, T.; IBUKI, F.; KOTARU, M. & KAN, K. K.: Amino acid composition of protein fractions extracted from *Phaseolus* beans and the field bean (*Vicia faba*, L.). J. Food Sci., 47: 1991-1994, 1982.
- KANESIRO, M. A. B.; FALEIROS, R. R. S.; BELLINGIERI, P. A. & ALBERTINI, P.E.G.: Metabolismo nitrogenado em *Lycopersicon esculentum* mill, cultivar Roma VF (tomateiro) cultivado em vaso IV. Variação dos teores de carboidratos. Cientifica 5: 276-280, 1977.
- KAPLAN, L.: Archeology and domestication in american *Phaseolus* (beans). Econ. Bot. 19: 358-68, 1965.

- KOEHLER, H. H.; CHANG, Ch.; SCHEIER, G. & BURKE, D. W.: Nutrient composition, protein quality and sensory properties of thirty-six cultivars of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) J. Food Sci., 52: 1335-1339, 1987.
- KUNITZ, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30: 291-310, 1947.
- LIENER, I. E.: Phytohemagglutinins (Phytolectins). Annu. Rev. Plant Physiol. 27: 291-319, 1976.
- LIENER, I. E. & THOMPSON, R. M.: In vitro and in vivo studies on the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr., 30: 13-25, 1980.
- LOOMIS, E. W. & BATAILLE, J.: Plant phenolic compounds and isolation of plant enzymes. Phytochemistry 5: 423-430, 1966.
- MARQUEZ, U. M. L. & LAJOLO, F. M.: Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. J. Agric. Food Sci., 29: 1068-1074, 1981.
- MCLEESTER, R. C.; HALL, T. C.; SUN, S. M. & BLISS, F. A.: Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *vicia faba*. Phytochemistry 12: 85-93, 1973.
- MEINERS, C. R.; DERISE, N. L.; LAU, H. V.; RITCHEY, S. J. & MURPHY, E. W.: Proximate composition and yield of raw and cooked mature dry legumes. J. Agric. Food Chem., 24: 1122-1126, 1976.
- MILLERD, A.: Biochemistry of legume seed proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 53, 1975.

- MILLER, J. B.; HSU, R.; HEINRICKSON, R. & YACHNIN, S.: Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 1388-1395, 1975.
- MORAES, R. M. & ANGELUCCI, E.: Chemical composition and amino acid contents of brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci. 36: 493-494, 1971.
- MOSSE, J. & PERNOLLET, J. C.: Storage proteins of legume seeds. In chemistry and biochemistry of legumes. (S. K. Arora, ed.). 111-193. Edward Arnold Publishers Ltd., London, 1983.
- NIELSEN, S. S. & LIENER, I. E.: Effect of germination on trypsin inhibitor and hemagglutinating activities in *Phaseolus vulgaris*. J. Food Sci., 53: 298-299, 1988
- NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION. ICN Diet Catalog, p 24, Cleveland, OHIO, 1977/78.
- OH, H. I. & HOFF, J. E.: pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins. J. Food Sci., 52: 1267-1269, 1987.
- OH, H. I.; HOFF, J. E.; HAFF, L. A. & ARMSTRONG, G. S.: Hydrofobic interaction in tannin-protein complexes. J. Agric. Food Chem., 28: 394-402, 1980.
- OLIVEIRA, A. C. & SGARBIERI, V. C.: The influence of rat endogenous nitrogen excretion on the assessment of bean protein quality. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 32: 425-436, 1986.

- OSBORNE, T. B.: The proteids of the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Am. Chem. Soc. 16: 633-643, 703-712, 757-764. 1894.
- OSBORNE, T. B.: The vegetable proteins. 2nd ed. Longmas Green and Co., London. 1924.
- PATTE, H. E.; SALUNKHE, D. K.; SATHE, S. K. & REDDY, N. R.: Legume lipids. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 17: 97-139, 1982.
- PEACE, R. W.; KEITH, M. O.; SARWAR, G. & BOTTING, H. G.: Effects of storage on protein nutritional quality of grain legumes. J. Food Sci., 53: 439-444, 1988.
- PHILLIPS, D. E.; EYRE, M. D.; THOMPSON, A. & BOULTER, D.: Protein quality in seed meals of *Phaseolus vulgaris* and heat-stable factors affecting the utilization of protein. J. Sci. Food Agric. 32: 423-432, 1981.
- PIMENTEL GOMES, F.: Curso de estatística experimental. 10ª ed., Nobel. 430 p. São Paulo, 1982.
- POMPEU, A. S.: Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.). Em feijão fatores de produção e qualidade. Campinas, Fundação Cargill. 3-27, 1987.
- PRICE, M. L.; SOCOYOC, S. & BUTLER, L. G.: A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 26: 1214-1219, 1978.
- PUSZTAI, A.; CLARKE, E. M.; GRANT, G. & KING, T. P.: The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunological studies. J. Sci. Food Agric. 32: 1037-1046, 1981.

- PUSZTAI, A.; CLARKE, E. M. & KING, T. P.: The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc. Nutr. Soc.* 38: 115-121, 1979.
- PUSZTAI, A.; CLARKE, E. M.; KING, T. P. & STEWART, J. C.: Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): Chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J. Sci. Food agric.* 30: 843-848, 1979.
- PUSZTAI, A.; GRANT, G. & PALMER, R.: Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): The isolation and partial characterization of toxic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 26: 148-156, 1975.
- PUSZTAI, A. & PALMER, R.: Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): The toxic principle. *J. Sci. Food Agric.* 28: 620-623, 1977.
- PUSZTAI, A. & WATT, W. B.: Glycoprotein II. The isolation and characterization of a major antigenic and non-hemagglutinating glycoprotein from *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Acta* 207: 413-431, 1970.
- REDDY, N. R.; SATHE, S. K. & PIERSON, M. D.: Removal of phytate from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) and its combined density fraction. *J. Food Sci.*, 53: 107-110, 1988.
- ROGERS, Q. R. & HARPER, A. E.: Amino acid and maximal growth in the rat. *J. Nutr.*, 87: 2167-2173, 1965.

- ROMERO, J. & RYAN, D. S.: Suceptibility of the major storage protein of the in vitro enzymatic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 784-788, 1978.
- SAITO, K.; YOSHIKAWA, H.; IKEUCHI, T. & IBUKI, F.: Purification and some properties of an α -amylase inhibitor from Cranberry Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agric. Biol. Chem.*, 51: 577-578, 1987.
- SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S. & SALUNKE, D. K.: Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 1. Chemical composition: Proteins. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 20: 1-46, 1984.
- SGARBIERI, V. C.: Composição e valor nutritivo do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Em feijão fatores de produção e qualidade. Campinas, Fundação Cargill. 257-316, 1987.
- SGARBIERI, V. C.: Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). A review *World Rev. Nutr. Dietetics*, 1989. (Em prensa).
- SGARBIERI, V. C.; ANTUNES, P. L. & ALMEIDA, L. D.: Nutritional evaluation of four varieties of dry beans. *J. Food Sci.*, 44: 1306-1309, 1979.
- SGARBIERI, V. C.; ANTUNES, P. L. & JUNQUEIRA, R. G.: Algumas propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas do feijão (*Phaseolus vulgaris*) var Rosinha G2. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2: 1-20, 1982.

- SGARBIERI, V. C.; TESOTO, S. & OLIVEIRA, A. C.: Improved quality of a new cultivar of *Phaseolus vulgaris*. *Phaseolus Inform. Exchange*, 1: 40-42, 1985.
- SGARBIERI, V. C. & WHITAKER, J. R.: Partial characterization of trypsin-chymotrypsin inhibitors from bean (*Phaseolus vulgaris*, L., var. Rosinha G2): Chemical and physical properties. *J. Food Biochem.*, 5: 215-232, 1981.
- SGARBIERI, V. C. & WHITAKER, J. R.: Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Adv. Food Res.* 8: 93-166, 1982.
- SIEVWRIGT, C. A. & SHIPE, W. F.: Effect of storage conditions and chemical treatments on firmness, *in vitro* protein digestibility, condensed tannins, phytic acid and divalent cations of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 51: 982- 987, 1986.
- SOUTHON, S.; WRIGHT, A. J. A.; PRICE, K. R.; FAIRWEATHER-TAIT S. J. & FENWICK, G. R.: The effect of three types of saponin on iron and zinc absorption from a single meal in the rat. *Brit. J. Nutr.*, 59: 389-396, 1988.
- SPACKMAN, D. C.; STEIN, W. H. & MOORE, S.: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30: 1190-1206, 1958.
- SPIES, J. R.: Determination of tryptophan in proteins. *Anal. Chem.*, 39 : 1412-1416, 1967.

- SUN, S. M. & HALL, T. C.: Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 23: 184-189, 1975.
- SWAIN, T.: The tannins, In *Plant Biochemistry*, (Bonner, J & Varner, E. V., eds.), Academic Press, New York. 552-580, 1965.
- TESOTO, S. & SGARBIERI, V. C.: The protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Agric. Food Chem.*, 1989. (submetido para publicação).
- TOBIN, G. & CARPENTER, K. J.: The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): A literature review. *Nutr. abstr. and Reviews-Series A. Human and Experimental*, 48: 919-936, 1978.
- TOMS, G. C. & WESTERN, A.: Phytohemagglutinins. In *Chemotaxonomy of Leguminosae* (J. B. Harborne, D. Boulter and B. L. Turner, eds.), 367-462. Academic Press, New York. 1971.
- TURNER, R. H. & LIENER, I. E.: The effect of the selective removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 23: 484-492, 1975.
- VAN DE KAMER, J. H. & VAN GINKEL, L.: Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chem.*, 29: 39-51, 1952.
- WHITAKER, J. R. & SGARBIERI, V. C. : Purification and composition of the trypsin-chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha G2 *J. Food Biochem.*, 5: 197-213, 1981.
- YAGI, F.; SAKAMOTO, M. SAYAWAKI, T.; TADERA, K.; KOBAYASHI, A. & ISHIHATA, K.: Lectins in mature pods of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. *Agric. Biol. Chem.* 49: 3575-3581, 1985.