

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**"EFEITO DO CONSUMO DE LEGUMINOSAS COZIDAS (FEIJÃO-COMUM,
Phaseolus vulgaris L. E ERVILHA, *Pisum sativum* L.) NO TAMANHO E
ATIVIDADE CELULAR DO INTESTINO DELGADO E NAS SECREÇÕES
DIGESTIVAS DE RATOS".**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ROSIMEIRE BORGES NASCENTES e aprovada pela Comissão Julgadora em 29.11.96.

Campinas, 29 de novembro de 1996


PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Presidente da Banca

ROSIMEIRE BORGES NASCENTES

Orientador:

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em
Ciência da Nutrição - Área de Nutrição Básica e Experimental**

CAMPINAS - SP

1996

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

N17e

Nascentes, Rosimeire Borges

Efeito do consumo de leguminosas cozidas (feijão-comun, *Phaseolus vulgaris L.* e ervilha, *Pisum sativum L.*) no tamanho e atividade celular do intestino delgado e nas secreções digestivas de ratos / Rosimeire Borges Nascentes. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Admar Costa de Oliveira.

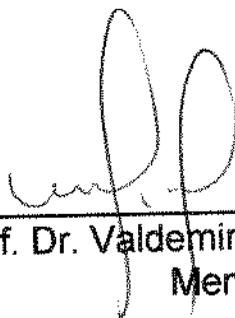
Dissertação (mestrado) -. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leguminosa. 2. Feijão comum. 3. Ervilha. 4. Intestino delgado.
5. Aparelho digestivo - Secreções. 6. Rato como animal de
laboratório. I. Oliveira, Admar Costa de II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Membro



Prof. Dr. Miguel Arçanjo Areas
Membro

Prof. Dr. Eduardo Antônio Bulisani
Membro

Campinas, Novembro de 1996

Aos meus Pais, Vicente e Sebastiana
Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prf. Dr. Admar Costa de Oliveira pela orientação e amizade no decorrer do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela viabilização econômica do curso.

À Fundação Hospitalar do Distrito Federal (FHDF) pela liberação tornando viável a realização do mestrado.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças - EMBRAPA/DF pelo fornecimento das sementes de feijão-comum e ervilha, respectivamente.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), nas pessoas do Prof. Dr. Waldemar Torniziello e Gilberto Furlan, pelas análises de radioatividade realizadas.

A Ronaldo Câmara de Araújo pelas análises estatística e companheirismo na etapa final do curso.

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas pelo auxílio nos ensaios biológicos e discussões científicas.

Às Técnicas Soely Reis e Eliete Leite pela valiosa contribuição na fase experimental e amizade durante o curso.

À Maria Tereza B. Pacheco pela colaboração nas análises químicas, incentivo e amizade

À Érika M. Marcondes Tassi, Renata Maria Texeira Duarte, Patrícia F. Zinsly, Dag Mendonça, Wanderléia F. Zóia (*in memoriam*), Lídia Cruz Neyra e Vera Lúcia R. Cruz e Walfrido pelo incentivo, amizade e companheirismo durante todo o curso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL.....	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT.....	X
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5 - CONCLUSÕES.....	54
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

ÍNDICE GERAL

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1. Introdução.....	01
2. Revisão da Literatura.....	04
2.1. Leguminosas na Alimentação Humana.....	04
2.1.1. Feijão-comum.....	04
2.1.2. Ervilha.....	05
2.2. Digestibilidade.....	06
2.2.1 Digestibilidade das Proteínas de Leguminosas.....	07
2.2.1.1. Fatores que Interferem na Digestibilidade Protéica de Leguminosas.....	08
2.2.1.1.1. Taninos.....	08
2.2.1.1.2. Fibra Alimentar.....	09
2.3. Nitrogênio Endógeno.....	11
2.3.1. Fontes de Nitrogênio Endógeno.....	13
2.3.1.1. Secreções Digestivas.....	13
2.3.1.1.1. Gástrica.....	13
2.3.1.1.2. Pancreática.....	14
2.3.1.1.3. Biliar.....	16
2.3.1.2. Descamação do Epitélio Gastrintestinal.....	17
2.3.1. Influência do Consumo de Leguminosas na Excreção de Nitrogênio Endógeno por Mamíferos.....	19
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Material.....	22
3.1.1. Fontes Protéicas.....	22
3.1.2. Ração Comercial.....	22
3.1.3. Radioisótopos.....	22
3.1.4. Animais.....	23
3.2 Métodos.....	23
3.2.1 Determinações Químicas.....	23
3.2.1.1 Composição Centesimal.....	23

3.2.1.1.1 Proteína Bruta.....	23
3.2.1.1.2 Lípides Totais.....	24
3.2.1.1.3 Fibra Alimentar.....	24
3.2.1.1.4. Umidade.....	24
3.2.1.1.5 Cinzas.....	24
3.2.1.1.6 Carboidratos.....	24
3.2.1.2 Ácido Ribonucléico - RNA.....	24
3.2.2. Determinação da Radioatividade Total.....	25
3.2.3 Ensaio Biológicos.....	25
3.2.3.1 Preparo das Fontes Protéicas.....	25
3.2.3.2 Dietas Experimentais.....	26
3.2.3.3 Suspensões Protéicas Experimentais.....	29
3.2.3.4 Ensaio de Incorporação de ³ H-uridina e ³ H-desoxicitidina aos Ácidos Nucléicos do Intestino Delgado.....	30
3.2.3.5 Ensaio de Incorporação de ³ H-triptofano às Secreções Digestivas.....	30
3.2.3.6 Determinação da Digestibilidade Protéica Aparente.....	31
3.3 Tratamento Estatístico.....	31
4 Resultados e Discussão.....	33
4.1 Composição Centesimal do Feijão-comum e Ervilha.....	33
4.2 Ensaio Biológicos.....	34
4.2.1 Ensaio de Incorporação de Nucleosídeos Tritiados aos Ácidos Nucléicos do Intestino Delgado.....	34
4.2.2 Ensaio de Incorporação de Aminoácido Tritiado às Secreções Digestivas.....	46
5 Conclusões.....	54
6 Referências Bibliográficas.....	56

RESUMO

Estudou-se o efeito das sementes de leguminosas cozidas (feijão-comum, *Phaseolus vulgaris* L. ou ervilha, *Pisum sativum* L.), ingeridas como fontes protéicas em dietas (contendo 12% de proteína) ou isoladas, no intestino delgado e nas secreções digestivas de ratos. Foram utilizados 39 ratos Wistar machos, recém-desmamados, marcados isotopicamente com ^3H -uridina, ^3H -desoxicitidina e ^3H -triptofano, respectivamente. Como controle utilizou-se caseína como fonte protéica em dieta ou pura.

O presente estudo foi dividido em dois ensaios biológicos. No primeiro, os ratos tiveram seus ácidos nucléicos marcados com ^3H -uridina e ^3H -desoxicitidina (i.p., 6,24 μCi /rato) após permanecerem nas dietas experimentais por seis dias. O objetivo deste ensaio foi observar possíveis alterações no tamanho e na atividade celular do intestino delgado. Os grupos de ratos mantidos em dietas contendo leguminosas apresentaram aumento no intestino delgado quando comparado ao grupo controle em dieta contendo caseína. Isto foi verificado através da elevação na matéria seca e conteúdo de proteína total do órgão, que foi de 10,0 e 17,4% maior, respectivamente, para ratos em dieta contendo feijão-comum e, 8,9 e 16,6% para ratos em dieta contendo ervilha, ambos em relação ao grupo controle. Observou-se também aumento no conteúdo de RNA e na radioatividade total do intestino delgado, de 43,4 e 112,5%, respectivamente, para ratos em dietas contendo feijão-comum e, 25,8 e 50,0% para o grupo em dieta contendo ervilha ($p < 0.05$). Os resultados obtidos indicam elevação na atividade celular do intestino delgado de ratos alimentados com dietas contendo leguminosas cozidas como fonte protéica.

No segundo ensaio, os ratos foram entubados, via orogástrica, com 100 mg de proteína provenientes da caseína, feijão-comum ou ervilha na forma de suspensão (em 4 mL de solução salina fisiológica), onde a quantidade de matéria

seca foi corrigida pela adição de amido de milho. O ensaio foi conduzido para verificar se a ingestão de proteína de leguminosas cozidas exerce algum efeito estimulatório sobre as secreções digestivas de ratos. Para atingir tal objetivo, os ratos foram marcados com 10,8 μ Ci de 3 H-triptofano, sacrificados e seu conteúdo gastrointestinal coletado duas horas *post cibum*. O teor de proteína e a radioatividade total do conteúdo gastrointestinal não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre as proteínas experimentadas.

Conclui-se que o aumento na excreção fecal de nitrogênio endógeno de ratos mantidos em dietas contendo leguminosas cozidas como fontes protéicas foi devido, principalmente, à elevação na descamação do epitélio intestinal mais do que ao efeito estimulatório sobre as secreções digestivas em ratos. É, também, provável que o feijão-comum causou maior excreção de nitrogênio endógeno do que a ervilha.

ABSTRACT

The effect of cooked leguminous seeds (common beans, *Phaseolus vulgaris*, L. or peas, *Pisum sativum*, L.) as protein source of diets (12% protein) or alone by orogastric intubation, on the small intestine and digestive secretions of rats was studied. Thirty-nine male Wistar rats labeled with ^3H -uridine and ^3H -deoxycytidine or ^3H -tryptophan, respectively, were used. A casein diet was utilized as a control.

Two biological assays were carried, in the first, the rats were labeled in their nucleic acids with the ^3H -uridine and the ^3H -deoxycytidine (i.p., 6.24 $\mu\text{Ci}/\text{rat}$) after been fed on the experimental diets for six days. The objective of this assay was to verify possible alterations in the size and cellular activity of the small intestine. It was found that the rats maintained on the the leguminous diets showed an enlargement of the small intestine as compared to the rats on the casein diet, with an increase in the dry weight and protein content of 10.0 and 17.4% , respectively, for the rats fed the common bean, and 8.9 and 16.6% for the rats fed the pea diet. It was also found an increase in the RNA content and total radioactivity of the small intestine of 43.4 and 112.5% for the rats on the common bean diet, and 25.8 and 50.0% for those the pea diet ($p < 0.05$). This fact indicated that there was an increased cellular activity in the small intestine upon feeding with leguminous diets.

In the second assay, 100 mg of protein of each source, casein, common beans or peas, were orogastrically intubated in the form of a suspension (4 mL in physiological saline solution), which had the amount of dry matter was corrected by the addition of cornstarch. The assay was performed in order to study if the ingestion of the cooked leguminous protein had stimulatory effect on the quantity of the digestive secretions of the rats. To reach this objective, the rats were labeled with 10.8 μCi of the ^3H -tryptophan, sacrificed and the gastrointestinal contents collected two hours *post cibum*. The protein and the total radioactivity of

the gastrointestinal contents showed no statistical differences ($p > 0.05$) among the experimental proteins.

It was concluded that the increase of fecal endogenous nitrogen excretion of rats maintained on diets containing the cooked leguminous seed as protein source, was mainly due to an increase of desquamation of the intestinal epithelium, rather than to a stimulatory effect of the rat's digestive secretions. It was also apparent that beans caused a larger excretion of endogenous nitrogen than peas.

1 - INTRODUÇÃO

As leguminosas são consideradas como uma das principais fontes de nutrientes das sementes da dieta humana, principalmente para os países em desenvolvimento, tanto em termos de alimento energético-protéico bem como fonte de outros componentes. Leguminosas são boas fontes de proteínas, vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina e vitamina B₆) e minerais (cálcio, ferro, cobre, zinco, fósforo, potássio e magnésio). Também são excelentes fontes de carboidratos complexos como amido, de ácidos graxos polinsaturados livres (linoléico e linolênico), de fibra alimentar solúvel, particularmente efetiva na redução dos níveis séricos de colesterol e glicose e de fibra alimentar insolúvel que promove o acúmulo do volume do bolo fecal, aumentando o peristaltismo e, assim diminuindo o tempo de trânsito intestinal.

Entretanto, algumas espécies como o feijão-comum tem vários atributos indesejáveis, como o longo tempo de cocção, a presença de inibidores de enzimas, fitatos, substâncias que causam flatulência, compostos fenólicos e lectinas, fatores que devem ser atenuados ou inativados para sua efetiva utilização.

Aproximadamente 171 milhões de toneladas métricas de grãos de leguminosas, incluindo soja e amendoim, são produzidas anualmente no mundo, ocupando o quinto lugar no "ranking" mundial em termos de produção de grãos. O feijão-comum contribui com 14,6 milhões de toneladas métricas (REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993). As leguminosas ocupam um lugar de destaque na alimentação humana, apresentando de duas a três vezes mais proteínas do que os cereais. O Brasil é de longe o maior produtor mundial de feijões com uma área produtiva de $4,3 \times 10^6$ hectares no período de 1980 e produtividade média de 600 Kg hectare⁻¹ (REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993). O consumo médio de feijões no Brasil, nos anos 1995/96, foi estimado em 20 kg per capita/ano, sendo o

feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) a leguminosa mais consumida (GONÇALVES, 1996).

O valor nutritivo de uma proteína é resultado da integração de vários fatores, destacando-se sua composição em aminoácidos, configuração espacial, susceptibilidade à digestão e a presença de outros componentes no alimento, bem como às condições de processamento a que foi submetida, o que pode comprometer sua digestibilidade.

Nas leguminosas, apesar do elevado teor protéico (20-50%), suas proteínas apresentam baixo valor nutricional, principalmente os cultivares da espécie *Phaseolus vulgaris* L., que é traduzido pela sua reduzida digestibilidade. Vários estudos comprovam que a baixa digestibilidade observada para algumas leguminosas é determinada pela aumentada excreção fecal de nitrogênio endógeno, verificada *in vivo*; mesmo quando a semente ingerida é cozida, e se esperaria que fatores antinutricionais como inibidores de enzimas digestivas e lectinas, estivessem inativados pelo tratamento térmico.

Para se identificar e quantificar o nitrogênio endógeno fecal em animais ingerindo dietas com leguminosas tem sido muito utilizadas, por vários pesquisadores, sementes marcadas com ^{15}N ou marcação isotópica do animal com radioisótopos (^{14}C e ^3H).

Apesar de já confirmada por vários autores, a maior excreção fecal de material nitrogenado de origem endógena, em animais consumindo dietas contendo leguminosas cozidas, entre as quais feijão-comum e ervilha, ainda permanece em discussão quanto à sua origem. Estudos feitos por pesquisadores como o de BENDER & MOHAMMADIHA (1981), SANDARADURA & BENDER (1983) e JALALI (1992), sugerem que o nitrogênio endógeno fecal é originado da maior descamação das células da mucosa intestinal de animais em dietas de feijão-comum cozido. Entretanto, outros trabalhos como o de FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983) não comprovam que a elevada perda fecal de material nitrogenado seja devido à descamação da mucosa intestinal.

Este trabalho foi conduzindo como objetivo de contribuir para o esclarecimento da questão exposta acima. Para tal, procurou-se verificar os efeitos

de dietas contendo leguminosas, feijão-comum ou ervilha, cozidas como fontes protéicas em dietas ou isoladas, na secreção de enzimas digestivas e na atividade celular do intestino delgado de ratos, comparando-os ao grupo de ratos controle em dieta contendo caseína, através da marcação isotópica de enzimas digestivas com aminoácido tritiado e dos ácidos nucléicos do intestino delgado com nucleosídeos tritiados. Para a escolha das leguminosas adotou-se o critério de importância na produção e consumo no país.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Leguminosas na Alimentação Humana

2.1.1 - Feijão-comum

O feijão-comum é um membro da família *leguminosae*, tribo *Phaseoleae*, subfamília *Papilinoideae*. As sementes podem ter formatos arredondados ou elípticos.

A contribuição do feijão-comum para dieta da população, principalmente em países em desenvolvimento, é apreciável. A inclusão de feijões na dieta é considerada, em termos de sua complementação, ao valor nutricional de dietas a base de cereais (WALKER, 1982). Além disso, os feijões são menos expansivos em termos territoriais que os animais (produzem-se mais em uma área menor) e têm considerável vida útil, muito maior que a de diversos produtos de origem animal, frutas e outros vegetais como as hortaliças.

O conteúdo de proteína varia de 16 a 33% (DESHPANDE et alii, 1985; SGARBIERI et alii, 1979). Os fatores que influenciam a qualidade nutricional das proteínas do feijão-comum incluem o padrão de aminoácidos e o grau de digestibilidade, bem como a quantidade e a qualidade de outras proteínas ingeridas junto às proteínas do feijão. O padrão de aminoácidos é caracterizado pela sua deficiência em aminoácidos sulfurados e triptofano (CARPENTER, 1981; BRESSANI et alii, 1963). Segundo DESHPANDE & NIELSEN (1987), a digestibilidade é determinada pela presença de fatores antinutricionais, estrutura da proteína, complexização da proteína com amido, hemicelulose e outros minerais

A cocção é, sem dúvida, o melhor método já conhecido para processamento de feijões. Ela inativa fatores antinutricionais termolábeis como inibidores de enzimas digestivas e lectinas, reduzindo os teores de taninos e fitatos. Geralmente a cocção é precedida por maceração, que tem como função diminuir o tempo de cocção e reduzir substâncias que causam flatulência

2.1.2 - Ervilha

A ervilha (*Pisum sativum*) é uma leguminosa importante como constituinte da dieta de várias comunidades asiáticas (MANAN et alii, 1987), européias (GUEGUEN & BARBOT, 1988) e, do Oriente Médio (SGARBIERI & WITAKER, 1982). Já na América Latina é a terceira leguminosa mais consumida (JAFFÉ, 1986) e no Brasil, ocupa o segundo lugar, somente precedida pelos feijões (SGARBIERI, 1980).

O conteúdo de proteína bruta varia de 20 a 30% (SHEKIB et alii, 1985), sendo de duas a três vezes o encontrado em grãos de cereais. Segundo WASSIMI et alii (1977), a ervilha também é boa fonte de outros nutrientes essenciais como vitaminas, minerais e fibras (BISKNOL & KHETARPAUL, 1994; AUCÉLIO, 1995). Entretanto, o valor nutricional da ervilha crua é muito discutido. O conteúdo relativamente baixo de aminoácidos sulfurados e a presença de fatores antinutricionais termolábeis (GRIFFITHS, 1981; BISHNOL & KHETARPAUL, 1994; SAHARAN & KHETARPAUL, 1994), estão implicados neste baixo valor nutricional.

Por outro lado, quando se compara o valor nutricional da ervilha com os dos feijões, a primeira parece oferecer algumas vantagens como, maior digestibilidade aparente, Da (79,4%); valor biológico aparente, VBa (81,7%) e uma maior utilização protéica líquida aparente, NPUa (64,9%), enquanto que para o feijão foram encontrados, respectivamente, 71,2%, 78,2% e 55,6 (DOMENE & OLIVEIRA, 1993). Outra vantagem atribuída à ervilha é relativa à cocção, que é bem menos severa que a necessária para os feijões. GRIFFITHS (1984) verificou um menor teor e atividade de inibidor de tripsina em diversas variedades de ervilha quando comparadas com os feijões. Entretanto, em relação ao conteúdo e atividade de inibidor de quimotripsina, foi observado o contrário.

As proteínas de ervilha são compostas na sua maioria por albumina e globulina. De acordo com EVANS & BOULTER (1980), o valor nutricional da proteína de ervilha diminui com o aumento da proporção de globulina, devido ao seu baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados.

O conteúdo de proteína bruta varia de 20 a 30% (SHEKIB et alii, 1985), sendo de duas a três vezes o encontrado em grãos de cereais. Segundo WASSIMI et alii (1977), a ervilha também é boa fonte de outros nutrientes

essenciais como vitaminas, minerais e fibras (BISKNOL & KHETARPAUL, 1994; AUCÉLIO, 1995). Entretanto, o valor nutricional da ervilha crua é muito discutido. O conteúdo relativamente baixo de aminoácidos sulfurados e a presença de fatores antinutricionais termolábeis (GRIFFITHS, 1981; BISHNOL & KHETARPAUL, 1994; SAHARAN & KHETARPAUL, 1994), estão implicados neste baixo valor nutricional.

Por outro lado, quando se compara o valor nutricional da ervilha com os dos feijões, a primeira parece oferecer algumas vantagens como, maior digestibilidade aparente, Da (79,4%); valor biológico aparente, VBa (81,7%) e uma maior utilização protéica líquida aparente, NPUa (64,9%), enquanto que para o feijão foram encontrados, respectivamente, 71,2%, 78,2% e 55,6 (DOMENE & OLIVEIRA, 1993). Outra vantagem atribuída à ervilha é relativa à cocção, que é bem menos severa que a necessária para os feijões. GRIFFITHS (1984) verificou um menor teor e atividade de inibidor de tripsina em diversas variedades de ervilha quando comparadas com os feijões. Entretanto, em relação ao conteúdo e atividade de inibidor de quimotripsina, foi observado o contrário.

As proteínas de ervilha são compostas na sua maioria por albumina e globulina. De acordo com EVANS & BOULTER (1980), o valor nutricional da proteína de ervilha diminui com o aumento da proporção de globulina, devido ao seu baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados.

2.2- Digestibilidade

No estômago, a hidrólise da proteína é iniciada pela ação da pepsina e ácido clorídrico. Metade dessas proteínas deixam o estômago na forma de peptídeos, a maioria solúvel em ácido tricloroacético (TCA), isto é, peptídeos com 10 ou menos aminoácidos (LOW, 1990). As proteínas e peptídeos que passam do estômago são hidrolisadas no intestino delgado por proteases pancreáticas (tripsina, quimotripsina, elastase, pepitdase, carboxipeptidase A e B). Dissolvidas na "brush border", as peptidases podem finalmente contribuir para a hidrólise antes da absorção de aminoácidos, di e tripeptídeos. A absorção da proteína alimentar ocorre basicamente no jejuno proximal, embora o íleo tenha considerável

capacidade digestiva e absorptiva (GRIMBLE & SILK, 1989). O maior sítio de assimilação da proteína endógena (secreção intestinal, proteínas plasmáticas e de células descamadas) ocorre no intestino posterior. Segundo GRIMBLE & SILK (1989) a perda de nitrogênio endógeno do intestino delgado é cerca de 10 a 20% do nitrogênio ingerido. Entretanto, a flora bacteriana no intestino grosso é capaz de digerir proteínas endógenas, bem como exógenas. Os aminoácidos liberados podem ser incorporados à proteína bacteriana ou desaminados e fermentados a ácidos graxos de cadeia curta.

2.2.1 - Digestibilidade das Proteínas de Leguminosas

Vários estudos relatados na literatura indicam que os componentes protéicos das sementes são menos atacados pelas endopeptidases digestivas dos mamíferos e são freqüentemente menos digeríveis do que as proteínas de origem animal (LYNCH, 1977a,b; ROMERO & RYAN, 1978). Como fatores responsáveis, tem-se, a nível molecular, a estrutura primária, conteúdo de aminoácidos, conformação da proteína e a presença de alguns fatores antinutricionais (NIELSEN,1991).

A baixa digestibilidade das proteínas de leguminosas, principalmente do feijão-comum, é atribuída a várias causas, entre elas tem-se (1) formação de complexos enzimas-proteínas resistentes como proteína-tanino ou ainda proteína-fitato (AW & SWANSON, 1985; ARTZ et alii, 1987); (2) inibição parcial direta de enzimas digestivas por fitatos ou compostos fenólicos (THOMPSON & YOON, 1984; THOMPSON & GABON, 1987); (3) conformação ou seqüência de aminoácidos desfavoráveis da proteína (CHANG & SATTERLEE, 1981); (4) interação proteína-proteína ou proteína-carboidrato durante tratamento térmico (SEMINO et alii., 1985).

2.2.1.1 - Fatores que Interferem na Digestibilidade Protéica de Leguminosas

2.2.1.1.1 - Taninos

Os taninos são uns dos vários fatores antinutricionais presentes nas leguminosas, localizando-se principalmente no tegumento da semente. O teor de taninos pode chegar a 2,0%, dependendo da variedade de leguminosa e da cor de seu tegumento.

A presença de taninos na dieta está associada à elevada excreção de nitrogênio fecal devido à interação entre eles e as proteínas alimentar, com as enzimas digestivas (MOSELEY & GRIFFITHS, 1979), ou ainda, como foi proposto por MITJAVILLA et alii (1977) o excesso de nitrogênio fecal pode ser devido a uma hipersecreção de muco ocasionado pela presença de taninos na dieta. De acordo com ELIAS et alii (1975), a baixa digestibilidade e utilização biológica da proteína de feijões coloridos é diretamente relacionada ao conteúdo de taninos desses feijões. ROMERO & RYAN (1978) observaram que a digestibilidade da proteína de leguminosas contendo altos teores de taninos é significativamente reduzida, principalmente devido à diminuição na atividade trípica.

MOSELEY & GRIFFITHS (1979) verificaram que o teor de compostos fenólicos em feijões afeta a digestibilidade de suas proteínas por complexização com a proteína alimentar ou por inibição da atividade enzimática ou formação de complexos não específicos com a proteína enzimática no intestino de ratos (ELIAS et alii, 1975). JANSMAN et alii (1994) encontraram redução na atividade de enzimas digestivas, principalmente da tripsina e aumento na secreção pancreática de enzimas digestivas em ratos consumindo dietas contendo compostos polifenólicos provenientes do tegumento do feijão. AW & SWANSON (1985), observaram, utilizando *Tetrahymena thermophyla*, que os taninos encontrados no feijão preto cozido se complexam com a globulina G1, formando um precipitado insolúvel e resistente a hidrólise enzimática, reduzindo a digestibilidade e qualidade da proteína. Outros autores também estudaram o efeito dos taninos sobre a digestibilidade da proteína de feijões como ALZUETA et alii (1992), que verificaram um aumento na excreção fecal de nitrogênio e diminuição na

digestibilidade verdadeira quando se incluía taninos à dieta de ratos (BRESSANI et alii, 1982).

AHMED et alii (1991) estudaram o efeito da dieta contendo taninos no pâncreas e mucosa do intestino delgado encontrando um aumento significativo na massa desses órgãos em pássaros alimentados com dietas contendo taninos de 50 e 25 g x Kg⁻¹ de dieta. Entretanto, segundo REDDY et alii (1985), a atividade antinutricional dos taninos de feijões e de outras leguminosas pode ser reduzida pelo processamento (um ou a combinação de dois ou mais métodos), por exemplo o descascamento, maceração, cocção e germinação. A cocção resulta na diminuição de 37,5 a 77,0% do conteúdo de taninos em feijões; alguns autores propõem que essa redução seja devido à mudança na sua solubilidade ou reatividade química (REDDY et alii, 1985).

2.2.1.2- Fibra Alimentar

A fibra alimentar constitui a porção das células vegetais que não pode ser digerida por enzimas do trato gastrintestinal humano. A maioria das substâncias encontradas na fibra alimentar são lignina e carboidratos não digeríveis como celulose, hemicelulose, pectinas e gomas.

Feijões secos são ricos em polissacarídeos não digeríveis que podem ter efeito benéfico na saúde humana como hipoglicemiante e hipocolesterolêmico (WALKER, 1982) e também na redução dos riscos de câncer do cólon (ANDERSON et alii, 1990; HUGHES, 1991). Geralmente as sementes de leguminosas contêm mais fibra do que a dos cereais, e também apresentam melhor equilíbrio entre fibra alimentar solúvel e insolúvel. A composição média de fibras em feijões é de 14 a 19%, dos quais até 7% é considerada solúvel e 13% insolúvel (HUGHES & SWANSON, citado por HUGHES, 1991; PAK et alii, 1990). O efeito benéfico para a saúde associado ao consumo de fibra alimentar resulta de uma combinação de mudanças fisiológicas, que se incluem em quatro categorias: (1) aumento do bolo fecal e diminuição do tempo de trânsito intestinal; (2) carreamento de ácidos biliares; (3) degradação a ácidos graxos de cadeia curta e; (4) aumento

da viscosidade reduzindo a digestão e absorção de alguns nutrientes. (HUGHES, 1991).

A despeito dessas vantagens acima enumeradas, certos polissacarídeos presentes nos feijões possuem características indesejáveis que limitam sua aceitação, como os oligossacarídeos que causam flatulência (LEEDS et alii, 1982), que podem variar de acordo com o cultivar e tratamento a que as sementes são submetidas antes do consumo. Outra característica indesejável é, segundo CHANG & SATTERLEE (1981), o seu efeito negativo sobre a hidrólise de proteínas nativas das leguminosas, através do bloqueio ao acesso da tripsina e quimotripsina aos peptídeos adjacentes aos resíduos de tirosina, fenilalanina, lisina e arginina. Porém, o tratamento térmico pode alterar a conformação dos carboidratos e ligação peptídeo-enzima específica, tornando a proteína mais susceptível à hidrólise enzimática.

O aumento na matéria seca das fezes e do nitrogênio fecal como consequência da ingestão de fibra alimentar foi proposto por de HARMUTH-HOENE & SCHWERDTFEGER (1979). MARQUEZ & LAJOLO (1990) verificaram que a excreção de matéria seca e nitrogênio pelas fezes em ratos alimentados com dieta contendo feijão-comum é diretamente proporcional à quantidade de fibra ingerida. Em consequência da excreção elevada de material nitrogenado nas fezes pode haver um comprometimento da qualidade protéica, como no caso de leguminosas (MARQUEZ & LAJOLO, 1990; MÉNDEZ et alii, 1993; ACEVEDO et alii, 1994).

MÉNDEZ et alii (1993) verificaram valores significativos de nitrogênio protéico nos resíduos de fibra e sugeriram a ocorrência de interação entre as proteínas e aminoácidos com os componentes da fração fibra insolúvel. Esse nitrogênio presente na fibra insolúvel contribui para a fração não utilizada do nitrogênio protéico, diminuindo assim a digestibilidade das proteínas de leguminosa. ACEVEDO et alii (1994) encontraram que , cerca de 29,5% das proteínas de feijão estão ligadas a fibra alimentar, a qual, provavelmente, não fica disponível a nível gastrintestinal, resultando em menor digestibilidade. Entretanto, esses autores sugerem que mais estudos devem ser feitos para estimar a digestibilidade das proteínas de feijão-comum ligadas à fibra alimentar.

2.3 - Nitrogênio Endógeno

Segundo BENDER & MOHAMMADIHA (1981) o nitrogênio fecal pode se originar de quatro fontes a saber: (1) proteína alimentar não digerida; (2) resíduo de secreções digestivas; (3) esfoliamento da parede do trato gastrointestinal e; (4) bactérias do trato digestivo.

A digestão de proteína alimentar por mamíferos requer a secreção de uma elevada quantidade de proteína endógena. DREISRACH & NASSET (1954) observaram que a quantidade de nitrogênio recuperado do lúmen do intestino delgado excede a quantidade de nitrogênio ingerido, indicando a possibilidade da liberação para o lúmen do trato gastrointestinal uma quantidade apreciável de proteína endógena em resposta à ingestão de dieta de qualquer tipo. Por outro lado, NASSET & JU (1961) e NASSET (1965) acreditam que a massiva secreção de nitrogênio endógeno mantém a homeostase do padrão de aminoácidos absorvidos.

NASSET & JU (1961) verificaram que, cães e ratos alimentados com dieta contendo caseína radioativa apresentaram uma elevada diluição do nitrogênio exógeno com o endógeno no intestino delgado, sendo mais de quatro vezes no caso de cães e de seis a sete vezes para ratos. Por outro lado, os dados encontrados por LOW (1979), são inconsistentes com uma massiva secreção de proteína endógena pelo intestino. Ele verificou, em porcos canulados, que o nitrogênio total do intestino não mostrou ganho significativo, a despeito da adição de nitrogênio endógeno da saliva, suco gástrico, suco pancreático, suco intestinal e células epiteliais descamadas. O autor ainda estimou que o nitrogênio endógeno de porcos em dieta aprotéica é de cinco a sete gramas por dia, o que corresponde a 15% do nitrogênio dietético utilizado no experimento.

Durante a passagem do bolo alimentar pelo trato digestivo há uma contínua digestão e absorção, bem como secreção de componentes endógenos. MOUGHAN et alii (1992) observaram uma quantidade apreciável de nitrogênio endógeno no intestino delgado de ratos marcados isotopicamente com ^3H -leucina e alimentados com caseína e aminoácidos sintéticos.

Uma outra importante fonte de nitrogênio endógeno é a grande massa de células da mucosa intestinal que são descamadas continuamente no lúmen. Toda mucosa do intestino delgado pode ser renovada de um a três dias, isto pode fornecer cerca de 90 gramas de proteínas por dia em um homem adulto. Porém, a quantidade de proteína endógena atribuída às secreções digestivas é, provavelmente, ainda maior, de 64 a 263 gramas por dia. (NASSET, 1965). Por outro lado, PARTRIDGE et alii (1982) observaram que a quantidade de nitrogênio endógeno secretado pelo pâncreas de porcos (massa corpórea de 50 kg) representa somente 3-6% do nitrogênio total que entra no duodeno.

De acordo com SOUTHON et alii (1985), o aumento na multiplicação celular e sua esfoliação no intestino delgado pode promover uma considerável fonte de nitrogênio endógeno na excreção fecal, embora isto dependa da extensão da qual as células da mucosa são esfoliadas e sua susceptibilidade à rápida digestão e reabsorção de seus componentes protéicos. Alternadamente a síntese e a reposição de proteínas e células maduras, juntamente com a produção de muco e outras proteínas secretadas no intestino, pode revelar a quantidade da proteína sintetizada e perdida no trato digestivo.

Tradicionalmente, a perda de nitrogênio endógeno é determinada pela alimentação com dieta aprotéica. Entretanto, esse método, segundo SGARBIERI et alii (1982), OLIVEIRA & SGARBIERI (1986a,b), SKILTON et alii (1988), BUTTS et alii (1992) e DOMENE & OLIVEIRA, (1993), pode levar a subestimação dos níveis fisiologicamente normais de excreção de nitrogênio endógeno sob condições de alimentação com peptídeo e proteína. A partir do exposto acima, alguns autores (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1984 e 1986a,b; OLIVEIRA et alii, 1988; JALALI, 1992; DOMENE & OLIVEIRA, 1993), vêm utilizando material radioativo para identificar e quantificar a efetiva participação do nitrogênio endógeno na qualidade protéica de leguminosas *in vivo*.

2.3.1 - Fontes de Nitrogênio Endógeno

2.3.1.1 - Secreções Digestivas

2.3.1.1.1 - Gástrica

A secreção gástrica inclui bicarbonato, ácido clorídrico, pepsinogênio, mucoproteínas e células descamadas (LOW, 1990). A regulação dessa secreção é feita através de complexo mecanismo neuro-hormonal e também pelo estímulo nutricional.

O estômago é um local importante na digestão de proteínas, onde é promovida também a acidificação do meio, a qual deprime ou elimina a atividade de microorganismos ingeridos com a dieta. Alimentos ricos em proteínas são poderosos estimulantes da secreção gástrica. A solubilidade da proteína também afeta a secreção de ácidos. Segundo DECYPÉRE et alii (1981), proteínas mais solúveis induzem uma maior e mais rápida secreção ácida do que proteínas insolúveis. De acordo com LOW (1990), a secreção gástrica tende a aumentar com o volume da refeição, tamanho de suas partículas e seu conteúdo de proteínas e quanto essa proteína é pepsina-digerível.

No estômago, encontra-se cerca de 20% da proteína total do trato gastrintestinal sendo ele também responsável por 8 a 14% do total de proteína sintetizada diariamente. A hidrólise de proteínas, no estômago, é iniciada pela ação da pepsina e ácido clorídrico. Metade dessas proteínas deixa o estômago na forma de peptídeos, em grande proporção solúveis em ácido tricloroacético (TCA), isto é, peptídeos com 10 ou menos aminoácidos (LOW, 1990). ZEBROWSKA (1968), administrando refeições com diferentes proteínas a ratos, verificou que a caseína foi mais rapidamente hidrolisada no estômago do que a proteína de soja, tratada ou não com calor. Enquanto isso, NEWPORT (1979) e PROTEIN digestion ... (1979) verificaram que o aparecimento da fração de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) no conteúdo gástrico de ratos, sacrificados uma hora após a alimentação, foi mais rápido para proteínas do leite de vaca do que para proteína de peixe ou isolado protéico de soja.

O tamanho das partículas da refeição, a viscosidade, a osmolaridade e a presença de ácidos orgânicos, ácidos graxos, proteínas ou aminoácidos e açúcares (principalmente amido e polissacarídeos não digeríveis) nas refeições interfere no esvaziamento gástrico. O esvaziamento gástrico de líquidos é, em grande parte, função do gradiente de pressão entre o estômago e o duodeno. Quanto ao esvaziamento de sólidos, ele só ocorre quando estes são reduzidos a partículas relativamente finas (< 20mm em tamanho) no estômago distal. A taxa de esvaziamento gástrico é proporcional ao grau de distensão do estômago.

2.3.1.1.2 - Pancreática

Segundo CORRING et alii (1989), mudanças dietéticas induzem importantes modificações na fisiologia das secreções pancreática e biliar. A biossíntese de enzimas pancreáticas é rapidamente adaptada à quantidade dos vários componentes da dieta ingerida, que alcança um determinado patamar quando a dieta é mantida por diversas refeições. Os mecanismos envolvidos nesta adaptação nutricional não estão ainda esclarecidos. De acordo com CORRING & SAUCIER (1972) e BOZKURT & HABERICH (citados por CORRING et alii, 1989), a adaptação pancreática a uma mudança na dieta se completa dentro de cinco a sete dias e um novo estado de equilíbrio é estabelecido. Por outro lado, DAGON & LAHAIE (1981) registraram que as mudanças na taxa de síntese de enzimas pancreáticas ocorre nas primeiras 24 horas após uma alteração na composição da dieta.

HOWARD & YUDKIN (1963) sugerem que a molécula de proteína intacta é responsável pela adaptação pancreática a uma dieta rica em proteína. Esses pesquisadores verificaram que a substituição da proteína intacta pelo seu hidrolisado na dieta não leva a qualquer aumento nos níveis de enzimas proteolíticas, mas ao contrário, à sua diminuição. Entretanto, GREEN & NASSET (1983) não encontraram diferença na atividade de enzimas pancreáticas em ratos alimentados com dieta contendo aminoácidos sintéticos ou caseína intacta.

A colecistoquinina (CCK) é freqüentemente considerada como principal fator intestinal para adaptação pancreática à dieta. Segundo GREEN et alii (1986), a CCK está envolvida na adaptação de proteases pancreáticas à proteína da dieta. Utilizando modelo com ratos, LIDDLE et alii (1985), verificaram que a proteína intacta tinha um efeito estimulador da secreção da CCK maior que seu hidrolisado.

A capacidade digestiva pode ser modificada por inúmeros estímulos, por exemplo, o próprio alimento. Um aumento na proteína na dieta induz um aumento na secreção pancreática de enzimas proteolíticas (TWOMBLY & MEYER, 1961), enquanto que uma maior ingestão de amido e gorduras leva a um aumento na secreção de amilase e lipase, respectivamente (CORRING et alii, 1989). A presença de fatores antinutricionais (ANF) e fibra alimentar também afetam a secreção enzimática.

A presença de inibidor de tripsina aumenta a secreção pancreática de tripsina e outras enzimas, enquanto que taninos podem induzir uma elevação nas proteínas ricas em prolina da saliva (GRIFFITS & MOSELEY, 1980; AHMED et alii, 1991; ALZUETA et alii, 1992), reduzindo assim os efeitos adversos dos taninos sobre a digestibilidade protéica (MEHANSHO et alii, 1987). Já as lectinas interferem na digestão e absorção por caminho diferente, ou seja, elas se ligam a receptores dos enterócitos induzindo mudanças no metabolismo das células epiteliais, aumentando a renovação celular e a secreção de proteínas. O efeito básico dos ANF sobre a digestibilidade é, provavelmente, devido a um aumento na perda de proteína endógena mais do que o efeito negativo sobre a digestibilidade da proteína exógena.

É também sabido que o conteúdo de fibras na dieta exerce um efeito na perda de aminoácidos endógenos (SKILTON et alii, 1988). A fibra pode reduzir a atividade enzimática no lúmen, mas também pode proteger as enzimas da sua degradação. Mudanças anatômicas em certas partes do trato digestivo, devido à fibra, podem ser vistas. Geralmente, as fibras estimulam significativamente a atividade microbiana no trato gastrintestinal e reduzem o tempo de trânsito intestinal do bolo alimentar. Embora a maioria do metabolismo microbiano ocorra no intestino grosso, a digestão pode ser influenciada pela microflora em todo trato

digestivo. De acordo com MASON (1984), a flora bacteriana pode sintetizar, bem como degradar aminoácidos individuais, alterando, deste modo, os valores de digestibilidade ileal aparente.

2.3.1.1.3- Biliar

A relação entre secreção biliar e consumo de fibra alimentar tem sido estudado em termos da composição fracionada de lípides da bile ou do metabolismo dos ácidos biliares. O efeito da fibra alimentar sobre o colesterol não é observado após uma única dose de alimentos ricos em fibra (IKEGAMI et alii, 1990), mas vem a ser estabelecido progressivamente durante a primeira semana de tratamento e permanece após um equilíbrio inicial.

Alterações no "pool" de ácidos biliares devido a uma modificação na síntese de ácidos biliares, trânsito intestinal, taxa de absorção e metabolismo bacteriano acontece provavelmente devido a mudanças a longo prazo na secreção biliar em resposta à ingestão de lípides e fibra alimentar, sem importante envolvimento de peptídios regulatórios (CORRING et alii, 1989)

2.3.1.2 - Descamação do Epitélio Gastrintestinal

A mucosa do intestino delgado é caracterizada por rápida proliferação celular e taxa de síntese protéica muito elevada quando comparada aos demais tecidos do organismo. A grande massa de células da mucosa intestinal deixa no lúmen grande quantidade de nitrogênio endógeno. Em 1971, DA COSTA et alii estimaram, através da determinação de ácidos nucléicos nas fezes, que a contribuição do nitrogênio endógeno de origem intracelular, resultante da esfoliação do epitélio intestinal, é de somente 10g para um total de 84g excretada em um dia. Por outro lado, McNURLAN et alii (1979) referem que a síntese protéica no intestino corresponde a mais de 14% do total da proteína corpórea sintetizada no rato. GARLICK et alii (1980) estudaram a taxa de síntese protéica em ratos, utilizando ³H-fenilalanina via intravenosa, verificaram que a mucosa jejunal foi o

tecido com maior renovação celular, seguida pelo tecido hepático, esplênico, pulmonar, muscular e cardíaco.

Objetivando localizar o sítio de produção de células da mucosa intestinal, QUASTLER & SHERMAN (1959), observaram que as células são produzidas nas criptas da mucosa do intestino delgado, migrando ao topo das vilosidade, onde são descamadas para a luz intestinal.

O aumento da nutrição, a nível luminal, acompanhada por mudança hormonal local e sistêmica, geralmente são considerados como fatores básicos responsáveis pela hiperplasia intestinal e aumento da atividade de enzimas da mucosa (KLEIN & MCKENZIE, 1983). A mucosa intestinal é extremamente sensível a redução de nutrientes na dieta, principalmente de proteína, o que é evidenciado através da menor proliferação celular e perda da massa celular associada ao declínio na síntese protéica, com diminuição da superfície absorptiva da mucosa intestinal (GARLICK et alii, 1975). Diversos fatores estão envolvidos no efeito estimulatório do alimento sobre a síntese de DNA no trato gastrointestinal, dentre os quais tem-se: (1) distensão mecânica da parede do trato digestivo; (2) constituintes nutricional ou mineral do alimento com efeito trófico; (3) liberação pós-prandial de hormônios como gastrina (EASTWOOD, 1977). GE & MORGAN (1993) sugerem um possível efeito trófico de outro hormônio, a colicistoquinina (CCK), que em níveis plasmáticos elevados atuaria estimulando o crescimento da mucosa do intestino delgado. Entretanto, JOHNSON (1987) refere que a CCK não é considerada como trófico para o intestino.

YOUNOSJAI et alii (1978) e ECKNAUER et alii (1981) demonstraram que, o crescimento da mucosa (proliferação celular e morfologia dos vilos), em animais bem nutridos, é aumentada pela inclusão de alimentos vegetais ricos em polissacarídeos não digeríveis na dieta. Porém, quando ECKNAUER et alii (1981) adicionaram celulose finamente dividida à dieta isenta de fibra não foi observado nenhum efeito estimulatório sobre a divisão celular. O mesmo resultado foi verificado quando modificou-se o conteúdo de proteína e gordura da dieta. Por outro lado, SILCAR et alii (1983) descobriram que ratos alimentados com dieta sintética, líquida ou sólida, apresentaram uma marcante redução na síntese de DNA na mucosa gástrica e colônica dentro de 12-24 horas após a modificação da

dieta e no entanto, nenhuma alteração foi observada na mucosa do intestino delgado. Um moderado aumento na massa intestinal relativa (massa intestinal por unidade de massa corpórea) pode acontecer em resposta à presença de alguma proteína vegetal na dieta como foi verificado por ROY et alii (1977), quando trocaram proteínas do leite por proteínas de soja.

SOULTON et alii (1985) observaram que ratos alimentados com dieta semi sintética, com 4% de celulose, apresentaram menor taxa de síntese protéica no jejuno e íleo (redução na produção de células a nível de cripta), quando comparado ao grupo que receberam dieta comercial peletizada com 9,9% de fibra alimentar (2,4% de celulose e 7,5% de polissacarídeos não celulósicos). A presença de grandes partículas da parede celular de vegetais em dieta peletizada exerce um estímulo mecânico direto sobre a mucosa, ocasionando aumento na esfoliação celular. Ou ainda, os constituintes da parede celular ou produtos de seu metabolismo pela flora intestinal, podem exercer estímulo bioquímico para divisão celular (SOULTON et alii, 1985).

SAKATA (1987) verificou que o efeito estimulatório dos ácidos graxos voláteis (produto do metabolismo de fibra alimentar pela flora intestinal) sobre a multiplicação celular pode explicar o efeito trófico da presença de fibras fermentáveis na dieta. O autor encontrou uma produção de células epiteliais 3 a 4 vezes menor em animais ingerindo dieta elementar isenta de fibras fermentáveis comparado a um grupo que recebeu dieta com fibra alimentar. Entretanto, essa elevada proliferação celular pode acontecer devido ao efeito abrasivo da fibra sobre a mucosa intestinal como proposto por TOPPING & ILLMAN, (1986). Considerando que 287g de células (6,5-12g de proteínas) são perdidas durante 24 horas pela mucosa gastrintestinal do homem, então um aumento de 3 a 4 vezes na perda de células epiteliais, ou seja, nitrogênio endógeno, pode ser significativo nutricionalmente. Isso requer, assim, mais proteína, o que não poderá ser fornecido pela metabolização dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela flora intestinal.

2.3.2 - Influência do Consumo de Leguminosas na Excreção de Nitrogênio Endógeno por Mamíferos

O nitrogênio endógeno excretado nas fezes é originário de três fontes, a saber: (1) secreções digestivas; (2) descamação do epitélio da mucosa intestinal e; (3) procedente da flora bacteriana do intestino (BUTTS et alii, 1992). Vários estudos já foram feitos para verificar a influência de dietas contendo leguminosas na estimulação da secreção de material endógeno, tanto em grãos crus (PUSZTAI et alii, 1981; HUISMAN et alii, 1990, 1992) como para sementes cozidas (BENDER & MOHAMMADIHA, 1981; SANDARADURA & BENDER, 1983; FAIRWEATHER-TAIT et alii, 1983; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1984, 1986a,b; MARQUEZ & LAJOLO, 1991; JALALI, 1992; DOMENE & OLIVEIRA, 1993). Porém, ainda não se sabe qual é a contribuição das secreções digestivas, esfoliação do epitélio intestinal e flora bacteriana para a mistura nitrogenada intestinal.

Para verificar e quantificar a participação do nitrogênio endógeno fecal nos baixos índices de digestibilidade e valor biológico para as proteínas de leguminosas; vários pesquisadores têm utilizado a marcação isotópica, principalmente com ^{14}C , ^{15}N e ^3H . Sendo o ^{14}C e ^3H incorporados, preferencialmente ao animal, marcando proteína endógena (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986b; HUISMAN et alii, 1990 e 1992); ou ácidos nucléicos (FAIRWEATHER-TAIT et alii, 1983; JALALI, 1992); enquanto o ^{15}N é utilizado tanto para marcar a proteína exógena (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a,b; MARQUEZ & LAJOLO, 1991; DOMENE & OLIVEIRA, 1993), como também a proteína endógena (HUISMAN et alii, 1990 e 1992). Através da utilização de radioisótopos é possível identificar e quantificar o nitrogênio endógeno e exógeno presente no lúmen intestinal e a taxa de multiplicação celular da mucosa intestinal de animais.

OLIVEIRA & SGARBIERI (1984 e 1986a,b) estudaram a interferência da excreção fecal de nitrogênio endógeno em ratos, na digestibilidade e valor biológico da proteína de feijão. Esses autores, através da utilização de sementes marcadas com ^{15}N ou injeção intravenosa de ^{14}C -glicina, puderam estimar o nitrogênio endógeno e exógeno (alimentar) nas fezes de ratos e verificaram elevada excreção fecal de material nitrogenado endógeno em animais consumindo dieta cuja fonte protéica era feijão em estado cru e cozido e, a partir desses

resultados concluíram que o nitrogênio endógeno constitui um importante fator nos baixos valores de digestibilidades e valor biológico observados para proteínas de feijão. OLIVEIRA & SGARBIERI (1986b) quantificaram o nitrogênio endógeno fecal em ratos alimentados com dietas contendo caseína, feijão cozido e cru, injetados com ^{14}C -glicina encontrando, respectivamente, 2, 5 e 10 vezes mais nitrogênio endógeno nas fezes do que no grupo submetido à dieta aprotéica. MARQUEZ & LAJOLO (1990) também utilizaram sementes de feijão marcadas com ^{15}N e ^{35}S para verificar o papel do nitrogênio endógeno na digestibilidade *in vivo* da proteína e observaram um aumento na excreção de nitrogênio tanto de origem endógena como exógena; os autores sugerem que essa elevação na perda de nitrogênio pode ser devido a interação da proteína do feijão com componentes não protéicos como a fibra alimentar (MENDEZ et alii, 1993; ACEVEDO et alii, 1994), carboidratos e/ou taninos (JANSMAN et alii, 1994) durante a cocção.

Utilizando a diluição isotópica com ^{15}N , DOMENE & OLIVEIRA (1993) avaliaram a digestibilidade e quantificaram o nitrogênio endógeno fecal (NEF) de três leguminosas (feijão-comum, ervilha e grão de bico) marcadas com ^{15}N , em ratos. Os autores não observaram diferença significativa entre as leguminosas para excreção fecal de nitrogênio endógeno, entretanto, quando estas foram comparadas à dieta aprotéica, esta última apresentou um valor 2,2 vezes menor para NEF. Já HUISMAN et alii (1992) verificaram diferença significativa para proteína endógena presente no íleo de suínos tratados com dieta contendo feijão e ervilha, sendo que a última apresentou menor nitrogênio endógeno no íleo (duas vezes mais do que para a dieta aprotéica, enquanto o feijão foi três vezes maior). MARTINEZ et alii (1995) também observaram que a ervilha (*Pisum sativum*) ocasionou menor efeito adverso ao animal do que outras leguminosa como a *Vicia faba* L. e o *Phaseolus vulgaris* L., atribuindo esse efeito à presença mais pronunciada de fatores antinutricionais nestas duas últimas leguminosas.

Em 1981, BENDER & MOHAMMADIHA referiram a importância da esfoliação do epitélio da mucosa intestinal como fonte de nitrogênio fecal e observaram que ratos tratados com dietas contendo feijão cozido apresentaram elevada excreção fecal de DNA quando comparados aos animais tratados com caseína. Resultados semelhantes foram obtidos por SANDARADURA & BENDER

(1983). FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983) concluíram, a partir de experimentos com ratos marcados com ^3H -timidina, que as dietas contendo feijão cozido causaram somente um pequeno aumento na renovação celular da mucosa intestinal. Os resultados encontrados por esses pesquisadores não confirmam a hipótese de que a baixa digestibilidade da proteína de feijão cozido é ocasionada pelo seu efeito estimulatório na divisão celular da mucosa intestinal. HUISMAN et alii (1990) e GE & MORGAN (1993) analisando o comprimento e matéria seca do intestino delgado de ratos, porcos e galinhas, não verificaram diferenças significativas entre o grupo de animais em dieta com feijão cozido e caseína. Entretanto, JALALI (1992) utilizando ^3H -adenosina em ratos, observou diferença significativa na radioatividade incorporada ao intestino delgado de ratos em dieta com feijão cozido quando comparados ao grupo em dieta com caseína e atribui, esta maior incorporação (radioatividade), ao aumento na proliferação celular da mucosa intestinal.

3 - MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 - MATERIAL

3.1.1 - Fontes Protéicas

Utilizou-se o cultivar de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), Carioca IAC-80, safra das águas de 1993, proveniente da Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)-Campinas-SP, com teor protéico médio de 21,7% e ervilha (*Pisum sativum* L.), cultivar Mikado, safra de 1994, proveniente do Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPQ)/EMBRAPA-Distrito Federal com teor protéico médio de 24,1%.

Como controle foi utilizado caseína comercial com teor protéico de 89,7%.

3.1.2 - Ração Comercial

Dieta não purificada de fórmula fechada, Nuvilab CR-1, da "Nuvital Nutrientes Ltda" com teor protéico mínimo de 22%, segundo especificações do fabricante.

3.1.3 - Radioisótopos

Foram utilizados o aminoácido L-(G-³H)-triptofano com atividade específica de 6,4Ci/mmol, para marcação das proteínas e os nucleosídeos (5-³H)-desoxicitidina, 24 Ci/mmol, e (5-³H)-uridina, 29 Ci/mmol, para marcação dos ácidos nucléicos dos ratos, todos provenientes de "The Radiochemical Centre, Amersham, England".

3.1.4 - Animais.

Utilizou-se 39 ratos albinos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados (21 dias), pesando em média $54,8 \pm 4,1$ g, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais durante o período experimental. No primeiro ensaio, com nucleosídeos marcados, os animais permaneceram dois dias na ração comercial para aclimação e seis dias nas dietas experimentais; e no segundo, com aminoácido marcado, os animais ficaram em dieta comercial durante todo o período de ensaio (oito dias). Desse modo, foi possível que os ratos atingissem a massa corpórea adequada para extração de órgãos e coleta do conteúdo gastrintestinal, de 90 a 100g, ao final dos dois ensaios biológicos. Tanto a ração comercial como as experimentais e água ficaram disponíveis permanentemente.

As condições ambientais do Laboratório de Ensaio Biológicos foram controladas, a fim de manter a temperatura a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Determinações Químicas

3.2.1.1 - Composição Centesimal

3.2.1.1.1 - Proteína Bruta

O nitrogênio foi determinado por método de Kjeldahl para amostras de leguminosas, caseína, quimo gastrintestinal e intestino delgado de ratos (AOAC, 1984); utilizando sulfato de potássio, sulfato de cobre e dióxido de titânio como catalisadores (WILLIAMS, 1973). A proteína bruta foi calculada pelo produto entre a percentagem de nitrogênio e os respectivos fatores de conversões, 5,4 para as

leguminosas (MOSSÉ, 1990), 6,38 para caseína (PAULL & SOUTHGATE, 1978) e 6,25 para as demais determinações de proteína.

3.2.1.1.2 - Lípides Totais

Foi determinado conforme método de BLIGH & DYER (1959), usando os solventes clorofórmio, metanol e água.

3.2.1.1.3 - Fibra Alimentar

Utilizou-se o método enzimico-gravimétrico descrito por ASP et alii (1983), o qual determina a fibra alimentar total, a fibra alimentar solúvel e insolúvel.

3.2.1.1.4 - Umidade

A determinação da umidade foi realizada por gravimetria, utilizando a estufa a 105°C até chegar a massa constante (PEARSON, 1976).

3.2.1.1.5 - Cinzas

Foram determinadas por incineração a 550°C em forno mufla (LEES, 1979), obtendo-se o resíduo mineral fixo.

3.2.1.1.6 - Carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado por diferença, subtraindo de 100% a soma dos valores encontrados nas determinações acima citadas.

3.2.1.2 - Ácido Ribonucléico - RNA

Para extração do ácido ribonucléico (RNA) foi utilizado o procedimento proposto por SCHIMIDT e THANNAUSER, modificado por MUNRO (1966) usando ácido perclórico (HClO₄) como agente extrator em substituição ao ácido tricloroacético (TCA). A caracterização e quantificação do RNA fez-se através de reação colorimétrica com orcinol (utilizando como catalisador FeCl₃ em

HCl concentrado), após hidrólise do ácido ribonucléico pelo ácido perclórico(0,25N) durante 30 minutos em ebulição. A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro a 570nm, usando como padrão RNA de fígado de rato de marca Sigma (HERBERT et alii, 1971).

3.2.2 - Determinação da Radioatividade Total

Amostras de 25 mg de intestino delgado e conteúdo gastrintestinal liofilizadas e homogeneizadas, em triplicata, foram oxidadas em "Biological Oxidizer", modelo OX 500 da "R. J. Harvey Instrument Corporation", por quatro minutos à temperatura de 900°C na zona de combustão e 680°C na zona catalítica, em sistema fechado com controle de fluxo de oxigênio (300cm³/min.) e nitrogênio (300cm³/min), para recuperação do trítio na forma de vapor de água (³H₂O) em 15mL de solução cintiladora [(2,0g de 2,5-Diphenyll Oxazole, 0,4g de (2,2-p-Phenylen-bis (5-Phenyl Oxazole), 600mL de tolueno e 400mL de Renex 95)] em frasco específico (R. J. HARVEY INSTRUMENT CORPORATION, 1990). Em seguida, os frascos foram transferidos para espectrômetro de cintilação líquida, marca Packard/Tri-carb, modelo 1600Tr , onde o decaimento por minuto (dpm) da radioatividade foi lido durante cinco minutos por amostra. Os valores obtidos foram convertidos em μCi ($1\mu\text{Ci} = 2.220.000 \text{ dpm}$) e os resultados expressos como radioatividade total para o intestino delgado e o conteúdo gastrintestinal.

3.2.3 - Ensaio Biológicos

3.2.3.1 - Preparo das Fontes Protéicas.

As sementes de leguminosas foram cozidas segundo procedimento doméstico, deixadas em maceração por 12 horas em água destilada, na proporção de três para um (água: semente), em seguida foram cozidas em panela de pressão por 40 e 10 minutos contatos a partir da fervura para feijão-comum e ervilha,

respectivamente. Após cocção, as sementes foram trituradas em liquidificador, congeladas, liofilizadas e moídas até a granulometria de 0,59 mm.

3.1.3.2 - Dietas Experimentais

As dietas foram elaboradas de acordo com as especificações do "American Institute of Nutrition-AIN 93G" (REEVES et alii, 1993), com a diferença da fonte protéica e de seu teor, que foi 12% (GOENA et alii 1989), para fins comparativos entre as fontes protéicas. Utilizou-se como controle dieta contendo 12% de caseína como fonte protéica. As formulações das dietas, bem como as misturas salina e vitamínica utilizadas para confecção das dietas encontram-se, respectivamente, nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Composição das dietas (g x Kg⁻¹ de dieta) utilizadas no ensaio*

Ingredientes	Dietas		
	Feijão-comum	Ervilha	Caseína
Feijão-comum	705,25	—	—
Ervilha	—	550,00	—
Caseína	—	—	211,14
Óleo vegetal	54,42	76,64	105,00
Fibra	—	—	75,00
Mistura mineral	35,00	52,50	52,50
Mistura vitamínica	10,00	15,00	15,00
L-cistina	01,80	01,80	01,80
Bitartarato de colina	02,50	02,50	02,50
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008
Amido	215,68	303,98	661,26
Amido dextrinizado	70,07	98,76	214,83
Sacarose	53,90	75,97	165,26

As dietas foram formulada de acordo com a AIN-93G (REEVES et alii, 1993), exceto para o teor protéico, que foi de 12% (GOENA et alii, 1989).

Tabela 2 - Composição da mistura mineral utilizada na preparação das dietas, AIN-93G-MX (REEVES et alii, 1993).

Ingredientes	gxKg ⁻¹ de mistura
Carbonato de cálcio, anidro	357,00
Fosfato de potássio, monobásico	196,00
Citrato de potássio, tripotássio monohidratado	70,78
Cloreto de sódio	74,00
Sulfato de potássio	46,6000
Oxido de magnésio	24,0000
Citrato férrico	6,0600
Carbonato de zinco	1,6500
Carbonato de manganês	0,6300
Carbonato cúprico	0,3000
Iodeto de potássio	0,0100
Selenato de sódio, anidro	0,0100
Paramolibdato de amônia, tetra hidratado	0,00795
Metasilicato de sódio, nonohidratado	1,45
Sulfato de potássio e cromo dodeca hidratado	0,275
Cloreto de lítio	0,0174
Ácido bórico	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635
Vanadato de amônia	0,0066
Carbonato de níquel	0,0318
Sacarose em pó	221,026

Tabela 3 - Composição da mistura vitamínica utilizada na preparação das dietas, AIN-93G-VX (REEVES et alii, 1993).

VITAMINA	g x Kg ⁻¹ mistura
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,000
Piridoxina - HCl	0,700
Tiamina - HCl	0,6000
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,2000
D-biotina	0,020
Vitamina B ₁₂	2,500
Vitamina E	15,000
Vitamina A	0,800
Vitamina D ₃	0,850
Vitamina K	0,075
Sacarose em pó	974,655

3.1.3.3 - Suspensões Protéicas Experimentais

Para preparação das suspensões foram utilizadas farinhas integrais de feijão-comum ou ervilha cozidas, liofilizadas e moídas até a granulometria de 0,15mm. Para evitar interferência da massa e volume das suspensões como fatores de estimulação da secreção gastrintestinal, as mesmas tiveram a mesma percentagem de matéria seca, através da adição de amido de milho em igual volume de solução salina a 0,9%. Como controle, utilizou-se a suspensão com caseína formulada do mesmo modo que as experimentais. O teor de proteína foi de 100 mg\4mL de suspensão por rato. A composição das suspensões utilizadas estão disposta na tabela 4.

Tabela 4 - Composição, por 4mL, das suspensões protéicas de caseína, feijão-comum e ervilha utilizadas no ensaio.

Ingredientes	Caseína	Feijão-comum	Ervilha
Caseína (mg)	118,4	—	—
Feijão-comum (mg)	—	483,9	—
Ervilha (mg)	—	—	435,1
Amido de milho (mg)	365,5	—	048,8
Solução salina (mL)	3,52	3,52	3,52

3.2.3.4 - Ensaio de Incorporação de ^3H -uridina e ^3H -desoxicitidina aos Ácidos Nucléicos do Intestino Delgado

Neste ensaio, foram utilizados 15 ratos (cinco animais por tratamento) que, após permanecerem seis dias nas dietas experimentais (feijão-comum ou ervilha) e controle (caseína) foram sacrificados em atmosfera de éter etílico (paralisia do bulbo raqueano) duas horas após injeção, i.p., de 100 μL de ($5\text{-}^3\text{H}$)-desoxicitidina e ($5\text{-}^3\text{H}$)-uridina, utilizando seringa da marca B-D para insulina, com atividade radioativa de 6,24 μCi por animal. Logo em seguida, removeu-se o intestino delgado *in totum*, a partir do piloro (junção estômago-duodeno) até o final do íleo; após mensuração do comprimento, foi lavado verticalmente com 20-30mL de solução salina gelada injetada com auxílio de seringa para completa remoção do conteúdo intestinal (GE & MORGAN, 1993), sendo então, pesado e congelado em nitrogênio líquido e, em seguida transferido para freezer a -80°C para análises de RNA e radioatividade.

Durante o ensaio, após período de adaptação de dois dias às dietas experimentais, foram coletadas fezes para cálculo da excreção fecal de nitrogênio e o consumo de nitrogênio quantificado durante quatro dias de balanço, para determinação da digestibilidade protéica aparente, a título de monitoramento. Os ratos foram pesados no início e no final do ensaio.

3.2.3.5 - Ensaio de Incorporação de ^3H -Triptofano às Secreções Digestivas.

Para estudar o efeito do consumo de leguminosas cozidas na secreção gastrintestinal foram utilizados 24 ratos machos, pesando 80 a 90g, mantidos em jejum prévio de 24 horas para esvaziamento gastrintestinal. Em seguida, foram entubados via orogástrica com catéter flexível (sonda uretral) de 15cm, por onde foi administrado, utilizando seringa de 5mL, 4mL das suspensões experimentais das leguminosas em estudo (feijão-comum e ervilha) e controle (caseína), contendo 100mg de proteína e igual teor de matéria seca por animal. Imediatamente após a entubação, os ratos foram injetados, intraperitonealmente, com 150 μL do radioisótopo L-($\text{G}\text{-}^3\text{H}$)-triptofano, utilizando seringa da marca B-D

para insulina, correspondendo à atividade radioativa de 10,8 μ Ci por animal. Duas horas após, os ratos foram sacrificados em atmosfera de éter etílico (paralisa do bulbo raqueano) e seus órgãos digestivos (estômago e intestino delgado) removidos a partir do esfíncter gastroesofágico até o final do íleo no intestino delgado. Após dissecados, foram mantidos verticalmente para drenagem e coleta do conteúdo gastrintestinal, com auxílio de seringa com 20-30 mL de solução salina a 0,9% gelada (GE & MORGAN, 1993), em placas de Petri previamente taradas, sendo então, congelados e liofilizados para análises de nitrogênio e radioatividade.

3.2.3.6 - Determinação da Digestibilidade Protéica Aparente

A título de monitoramento foi determinada a digestibilidade aparente da proteína das leguminosas em estudo (D_a), segundo PELLET & YOUNG (1980). Quantificou-se o consumo de nitrogênio (NI-nitrogênio ingerido) durante os quatro dias de balanço através do controle (pesagem) da ração nos comedouros, bem como o nitrogênio excretado pelas fezes (NF-nitrogênio fecal); para cálculo da D_a foi utilizado a seguinte fórmula:

$$D_a = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

3.3 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, a qual consistiu-se de uma análise descritiva parcial dos dados, para, em seguida fazer-se a análise em planejamento de experimentos (COCHRAN & COX, 1957). Como os experimentos foram conduzidos aleatoriamente e não houve nenhuma outra fonte de variação além do tratamento, estes podem ser considerados como experimentos inteiramente casualizados. Os dados, então, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), através do teste de F. Para saber se os tratamentos

eram significativamente diferentes e, como neste caso existe um controle (caseína), o teste de médias mais indicado foi o teste de Dunnett's (MONTGOMERY, 1991). Os testes estatísticos foram considerados ao nível de confiança de 5%.

Todos os modelos aqui considerados satisfazem as pressuposições para o ajuste do modelo, ou seja, os dados apresentaram distribuição normal, as variâncias foram constantes e os erros, independentes e identicamente distribuídos. Verificou-se também que não houve pontos discrepantes ("outliers"), isto é, os dados foram aproximadamente iguais e a única fonte de variação foi devida ao tratamento.

Entretanto, no primeiro ensaio biológico, a massa corpórea inicial dos animais apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e, como todas variáveis posteriores, dependem da massa corpórea inicial do rato ser considerado homogêneo ou semelhante para os três tratamentos, então, para evitar influência da massa corpórea inicial nas demais variáveis estudadas, usou-se um modelo inteiramente casualizado com uma co-variável, nesse caso massa corpórea inicial.

As variáveis teor de proteína e radioatividade total do conteúdo gastrointestinal de ratos (segundo ensaio) foram submetidas à análise de correlação simples, utilizando o nível de confiança de 5%.

Para execução das análises estatística dos dados obtidos nos dois ensaios biológicos foi utilizado o "software" estatístico "SAS", versão 6.10.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Na Tabela 1 encontram-se as informações quanto à composição centesimal das leguminosas usadas como fontes protéicas no presente estudo. A composição do feijão-comum e ervilha são bastante semelhantes, com pequena diferença no teor protéico, maior para ervilha, o que também foi observado por DOMENE (1990) e HUISMAN et alii (1992), e na quantidade de fibra alimentar total, sendo que neste nutriente o feijão-comum apresentou um teor mais elevado. De modo geral, os resultados aqui apresentados para composição centesimal estão de acordo com os encontrados na literatura (DOMENE, 1990; JALALI, 1992, AUCÉLIO, 1995).

Tabela 5 - Composição Centesimal das Leguminosas *Phaseolus vulgaris*, cultivar Carioca IAC-80 (feijão-comum) e *Pisum sativum*, cultivar Mikado (ervilha).

Nutrientes	Feijão-comum	Ervilha
Proteína	21,70	24,13
Lípides	2,08	2,23
Fibra alimentar total*	10,14	7,58
Cinzas	3,21	2,77
Umidade	5,35	5,17
Carboidrato**	57,52	58,12

Nota: * Valores obtidos a partir da soma de fibra alimentar solúvel e fibra alimentar insolúvel.

** Valores obtidos por diferença.

4.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 - Ensaio de Incorporação de ^3H -uridina e ^3H -desoxicitidina aos Ácidos Nucléicos do Intestino Delgado.

Nas figuras 1 e 2 tem-se, respectivamente, o massa corpórea inicial e final, e o consumo de dieta e o ganho de massa dos animais após seis dias de tratamento. Nota-se que a diferença entre as dietas para a massa corpórea inicial e final foi pequena, os animais tiveram respostas semelhantes para os três tratamentos, controle (caseína), feijão e ervilha. KADAN et alii (1987) também observaram resposta semelhante para ganho de massa de ratos tratados com dieta contendo leguminosa cozida (feijão-comum), como fonte protéica, quando comparado à dieta controle contendo ovalbumina. Entretanto, aplicando teste estatístico para estas variáveis, nota-se que para massa corpórea inicial houve diferença significativa entre os animais em dieta contendo caseína como fonte protéica e os grupos em dieta contendo leguminosas cozidas, feijão-comum ou ervilha (vide figura 1).

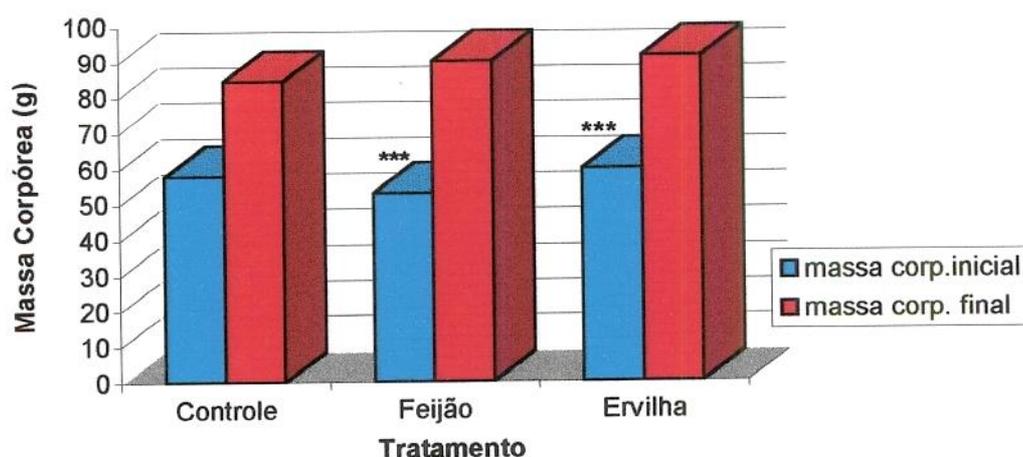


Figura 1 - Massa Corpórea inicial e final de ratos em dietas contendo 12% de proteína proveniente de caseína (controle), feijão-comum ou ervilha, após seis dias de tratamento. * indicam diferença estatística em relação ao controle.**

A diferença observada para massa corpórea inicial dos ratos indica a não homogeneidade dos animais fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Por outro lado, a massa corpórea final alcançado pelos mesmos animais foram semelhantes estatisticamente para os três tratamentos, como também pode ser visto na figura 1.

Porém, na figura 2, observa-se uma pequena diferença visual, mas não estatística, entre os tratamentos quanto ao ganho de massa, no qual os ratos em dieta contendo feijão tiveram um ganho de massa 39,9% maior que os animais controle (caseína) e para o grupo em dieta contendo ervilha verifica-se que a diferença em relação ao controle é de 19,1%. Enquanto que, para o consumo de dieta, a diferença foi de 8,4 e 23,5% para, respectivamente, feijão e ervilha em relação ao controle. Isto demonstra, um maior consumo de dietas contendo leguminosas como fonte protéica como possível forma de compensar a baixa biodisponibilidade de nutrientes ou, ainda, devido à baixa qualidade da proteína das leguminosas quando comparadas à caseína, necessitando de maior ingestão protéica para satisfazer a necessidade de aminoácidos essenciais no caso das leguminosas estudadas.

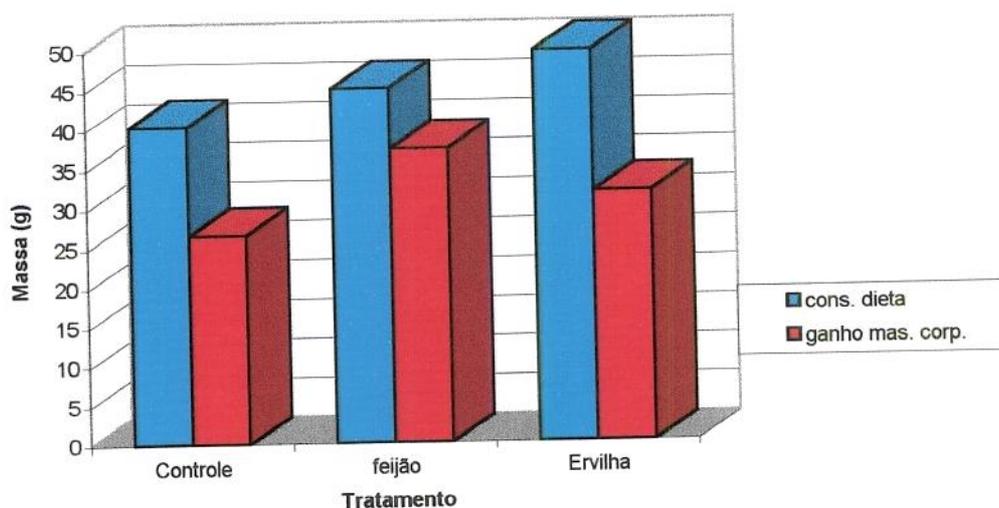


Figura 2 Consumo de dieta e ganho de massa corpórea de ratos em dietas contendo 12% de proteína proveniente de caseína (controle), feijão-comum ou ervilha, após seis dias de tratamento.

O que também poderia contribuir para tal fato, é um possível melhor aproveitamento da dieta, em termos calóricos, dos animais tratados com dietas de feijão e ervilha ou, ainda, um provável maior teor de fibras fermentáveis nestas dietas, proporcionando maior fonte calórica através da produção de metabólitos energético como os ácidos graxos voláteis pela flora intestinal. As dietas com feijão e ervilha continham aproximadamente 50% a mais de fibra alimentar do que a dieta de caseína (adição de 5% de celulose segundo especificações da AIN - 93G, REEVES et alii, 1993), além da presença de fibra alimentar solúvel nas duas primeiras dietas provenientes das sementes utilizadas como fontes protéicas, o que não foi acrescentado à dieta com caseína. Outro fator também importante é que os animais, nos três tratamentos, também não apresentaram diferença estatística quanto à ingestão e absorção de nitrogênio, como pode ser visto na tabela 6, sugerindo que o teor da proteína ingerida e absorvida não interferiu no ganho de massa corpórea dos ratos para os três tratamentos.

Na Tabela 6 encontram-se os valores referentes ao nitrogênio ingerido (NI), fecal (NF) e absorvido (NA) e a digestibilidade aparente (Da) das proteínas em estudo, após quatro dias de balanço precedidos por dois dias de adaptação às dietas. Os dados obtidos para NI e NA para dietas com feijão e ervilha não diferiram estatisticamente em relação ao controle (caseína), mostrando que os animais tiveram ingestão protéica semelhantes nos três tratamentos.

Entretanto, analisando os valores obtidos para excreção fecal de nitrogênio, nota-se uma diferença significativa entre as dietas com leguminosas e caseína para esta variável, sendo que os animais em dieta com leguminosas excretaram de três a quatro vezes mais nitrogênio fecal. Porém, nota-se que os ratos em dieta com feijão-comum excretaram 39,7% a mais de nitrogênio fecal do que o grupo em dieta com ervilha, DOMENE (1990) também verificou que ratos alimentados com dieta contendo ervilha excretaram menos nitrogênio pelas fezes do que o grupo em dieta com feijão-comum, o que implicou numa maior digestibilidade da primeira leguminosa.

Tabela 6- Nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio fecal (NF), nitrogênio absorvido (NA), digestibilidade protéica aparente (Da), após quatro dias de balanço em ratos alimentados com dietas contendo caseína, feijão-comum e ervilha.

Tratamento	NI (mg)	DP*	NF (mg)	DP*	NA (mg)	DP*	Da (%)	DP*
Caseína	885	70	76,6	10,0	808	70	91,3	1,02
Feijão	1.052	90	335,1***	30,0	717	110	67,9***	4,49
Ervilha	1.177	250	239,9***	40,0	937	210	79,4***	1,47

Nota: Médias seguidas por *** diferem em relação ao Controle (caseína), pelo Teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05

* DP: desvio padrão para a média de cinco ratos por tratamento.

DOMENE & OLIVEIRA (1993) e FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983) observaram valores de nitrogênio fecal, duas a quatro vezes maiores em animais alimentados com dieta contendo leguminosas (feijão-comum ou ervilha cozidas) comparados a um grupo controle com caseína. Por outro lado, o que poderia explicar a diferença entre os valores obtidos para NI, NA e NF, isto é, o que contribuiu para maior excreção fecal de nitrogênio, já que não houve diferença estatística (coeficiente de variação de 16%) entre as dietas para nitrogênio ingerido e absorvido, é a baixa digestibilidade associada a uma elevada excreção fecal de nitrogênio endógeno em animais consumindo dieta com leguminosas, mesmo em estado cozido, como já foi observado por vários pesquisadores (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a,b; OLIVEIRA et alii, 1988; MARQUEZ & LAJOLO, 1991; JALALI, 1992; DOMENE & OLIVEIRA, 1993).

Segundo MARQUEZ & LAJOLO (1991), existem várias razões, ainda não claras, para o aumento da excreção de nitrogênio fecal em animais alimentados com dieta contendo feijão. Os autores sugerem a ocorrência de prováveis interações das proteínas do feijão ou das enzimas digestivas com componentes não protéicos presentes no feijão como fibra, carboidratos e taninos (GRIFFITHS & MOSELEY, 1980; AW & SWANSON, 1985; AHMED et alii, 1991; ALZUETA et alii, 1992; JANSMAN et alii, 1994), diminuindo assim a digestibilidade das proteínas de leguminosas. Entretanto, a atividade antinutricional de taninos

pode ser reduzida de 37,5 a 77,0% pelo processamento como maceração e cocção (REDDY et alii, 1985).

Quanto aos valores obtidos para digestibilidade aparente, também estão de acordo com a literatura (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986; JALALI, 1992; DOMENE & OLIVEIRA, 1993). Os baixos índices encontrados para o feijão-comum e ervilha confirmam o possível papel do nitrogênio endógeno na qualidade da proteína de leguminosas, como já visto por vários autores (BENDER & MOHAMMADIHA, 1981; SANDARADURA & BENDER, 1983; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1984 e 1986a,b; MARQUEZ & LAJOLO, 1990; JALALI, 1992; HUISMAN et alii, 1990 e 1992; DOMENE & OLIVEIRA, 1993). Alguns autores (HUGHES, 1991; MARQUEZ & LAJOLO, 1991; MÉNDEZ et alii, 1993; ACEVEDO et alii, 1994), sugerem que a fibra alimentar presente nas leguminosas podem formar complexos indigeríveis com proteínas e aminoácidos, principalmente durante o tratamento térmico (MÉNDEZ et alii, 1993), reduzindo a disponibilidade do nitrogênio protéico para absorção e, diminuindo, conseqüentemente, a digestibilidade da proteína.

Os animais submetidos às dietas contendo feijão ou ervilha cozidas, como fonte protéica, apresentaram uma excreção de matéria fecal bem mais elevada, de duas a três vezes maior do que o grupo com caseína, mesmo quando se tentou anular o efeito da quantidade de dieta ingerida como fator responsável pela maior excreção fecal, como pode ser visto na Tabela 7. PUSZTAI et alii (1981), LEEDS et alii (1982); FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983); MARQUEZ & LAJOLO (1990) e McPHERSON (1991) também verificaram diferenças significativas entre ratos tratados com dietas contendo caseína e com feijão cozido.

Tabela 7 - Excreção fecal total e por dieta consumida de ratos alimentados com dietas contendo caseína (controle) feijão-comum e ervilha como fontes protéicas durante quatro dias de balanço.

Tratamento	Exc.Fecal Total (g)	DP*	Exc. Fecal por Dieta Ing. (g \times kg ⁻¹)	DP*
Caseína	2,65	0,44	65,2	2,22
Feijão	7,37***	1,36	143,2***	10,13
Ervilha	4,30***	0,40	97,0***	6,68

Nota: Médias seguidas de *** diferem em relação ao controle (caseína) pelo teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05.

* DP: desvio padrão para média de cinco animais por tratamento.

Segundo MARQUEZ & LAJOLO (1990) a quantidade de fibras presente na dieta pode contribuir para uma maior excreção fecal total (LEEDS et alii, 1982) e de material nitrogenado devido a possíveis interações entre fibra e proteína exógena ou endógena, formando complexos não digeríveis, aumentando o bolo fecal e a perda de nitrogênio fecal. Neste experimento, tentou-se controlar o efeito da fibra na função digestiva do animal através da adição de 5% de fibra (celulose) às dietas (REEVES et alii, 1993); entretanto as dietas com leguminosas continham 50% a mais de fibra alimentar (fibra alimentar solúvel e insolúvel).

Na Tabela 8 e figuras 3 e 4, tem-se as medidas (matéria seca, comprimento e espessura) do intestino delgado (ID) por Kg de massa corpórea de ratos submetidos ao tratamento com dietas contendo leguminosas cozidas (feijão-comum ou ervilha) e caseína (controle). Nota-se que, em relação a matéria seca do intestino delgado, existe diferença significativa entre os tratamentos, sendo que os animais que consumiram dietas contendo leguminosas apresentaram o intestino delgado mais pesado do que o grupo com caseína, sugerindo, então, que dietas cuja fonte protéica foram sementes de leguminosas cozidas podem estimular a renovação celular da mucosa do intestino delgado. Maior atividade celular pode indicar elevada esfoliação celular, que contribui para a excreção fecal de nitrogênio endógeno aumentada em animais tratados com feijão-comum cozido (BENDER & MOHAMMADIHA, 1981; SANDARADURA & BENDER, 1983; JALALI, 1992).

MARTINEZ et alii (1995) também observaram diferença significativa na matéria seca do intestino delgado de ratos alimentados com dieta contendo ervilha como fonte protéica, em relação a ratos em dieta controle de caseína.

Tabela 8 - Massa corpórea e matéria seca do intestino delgado por kg de massa corpórea de ratos em dietas contendo caseína, feijão-comum e ervilha, após seis dias de tratamento.

Tratamento	Massa.corpor. (g)	DP*	Mat.seca ID (g \times kg ⁻¹)	DP*
Caseína	84,5	4,62	7,95	0,48
Feijão	90,1	4,06	8,66***	0,94
Ervilha	91,5	8,14	8,55***	0,66

Nota: Médias seguidas por *** diferem em relação ao controle (Caseína) pelo teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05.

* DP: desvio padrão para a média de cinco animais por tratamento.

SOULTON et alii (1985) também encontraram diferença significativa para a massa da mucosa do intestino delgado entre ratos alimentados com dieta semi sintética (isenta de fibra) e dieta comercial peletizada com alto teor de fibra alimentar, porém nenhuma diferença foi observada para o comprimento intestinal por massa corpórea e espessura da mucosa (massa da mucosa por unidade de comprimento do intestino delgado). Por outro lado, analisando as figuras 3 e 4, nota-se que os intestinos delgados dos ratos tratados com dieta cuja fonte protéica era o feijão-comum apresentaram as medidas de comprimento e espessura maiores, seguido pelos grupos com ervilha e caseína.

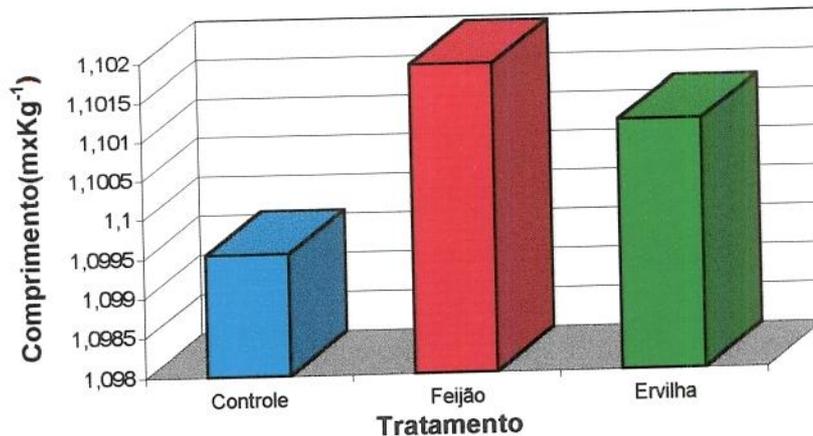


Figura 3 - Comprimento do intestino delgado por Kg de massa corpórea de ratos em dietas contendo leguminosas (feijão-comum ou ervilha) e caseína (controle) após seis dias de tratamento

McPHERSON (1991) observou que a mucosa do intestino delgado de ratos consumindo feijão cozido apresentava-se edemaciada (mais pesada) e com processo inflamatório crônico após oito semanas de tratamento. DESHPANDE et alii (1982) e REDDY et alii (1985), sugerem que taninos presentes no feijão podem ser responsáveis pelas alterações observadas na mucosa intestinal. Entretanto, outros pesquisadores atribuem essas modificações na mucosa do intestino delgado à presença crônica de fibra na dieta (BROWN et alii, 1979; JACOBS, 1983; CALVERT et alii, 1985). TASMÁN-JONES et alii (1982) observaram diferenças significativas no número de vilos no jejuno e íleo de ratos alimentados com dieta acrescida de celulose e pectina (cerca de 10%), comparada com dieta isenta de fibra alimentar. GE & MORGAN (1993) verificaram um aumento de massa, por hipertrofia (aumento na massa e conteúdo de RNA e proteína) e hiperplasia (aumento no DNA total), na camada *mucosae* e muscular do intestino delgado em ratos tratados com farinha de soja tratada termicamente.

De acordo com GREER et alii (1985), aumentos moderados na massa relativa do intestino podem ser observados em resposta à presença de algumas proteínas vegetais na dieta. ROY et alii (1977) também verificaram um aumento na espessura do intestino (massa por unidade de comprimento), quando substituíram a dieta contendo leite por soja, sugerindo que aumento da nutrição luminal seguida por mudanças sistêmicas hormonais são os principais fatores responsáveis por

hiperplasia intestinal e aumento na atividade enzimática da mucosa (KLEIN & McKENZIE, 1983). SIRCAR et alii (1983) referem-se à importância do hormônio gastrina como mediador na indução, pela dieta, da síntese de DNA na mucosa gastrointestinal.

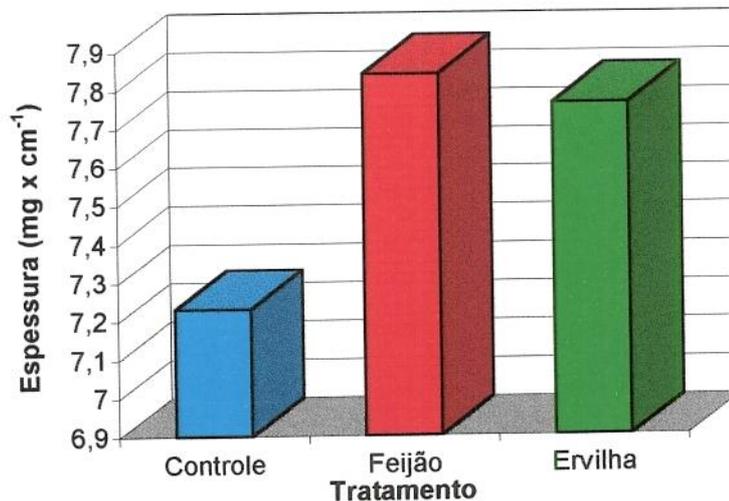


Figura 4 - Espessura do intestino delgado (matéria seca por unidade de comprimento) de ratos em dietas contendo 12% de proteína proveniente de caseína (controle), feijão-comum ou ervilha, após seis dias de tratamento.

Os efeitos de dietas com leguminosas (grão de bico, soja e feijão-comum) sobre a mucosa intestinal de ratos também foram estudados por GRANT et alii (1995), após 30, 200 e 700 dias de tratamento com as dietas. Esses pesquisadores observaram aumento relativo na massa do intestino delgado nos animais alimentados com dieta contendo feijão-comum, tanto a curto (30 dias) como a médio (200 dias) e longo prazo (700 dias), quando comparado a um grupo de animais controle em dieta contendo caseína.

A presença de lectina nas sementes de feijão-comum consumidas no estado cru, está implicada em alterações de massa, comprimento e de medidas bioquímicas (proteína, RNA e DNA) a nível de mucosa, principalmente do intestino delgado, como já documentado por vários pesquisadores (PUZSTAI et alii, 1981; KING et alii, 1983; GREER et alii, 1985; HUISMAN et alii, 1990). Por outro lado, quando consumidas no estado cozido, com as lectinas inativadas pelo tratamento térmico, as leguminosas não exerceram nenhum efeito sobre a mucosa do intestino delgado de ratos como verificado por GREER et alii (1985).

O aumento na matéria seca do intestino delgado de ratos em dietas contendo leguminosas cozidas refletem também mudanças nos seus parâmetros bioquímicos (proteína e RNA total) e na radioatividade (tabela 9). Verifica-se uma diferença significativa para conteúdo de proteína total dos animais tratados com leguminosas (feijão-comum e ervilha) em relação ao controle com caseína, vide Tabela 9. O mesmo foi verificado por FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983), que observaram aumento de 28% na proteína da mucosa intestinal em ratos alimentados com feijão cozido em relação ao grupo controle com caseína. Isto pode indicar uma maior síntese protéica na mucosa do intestino delgado nos animais que consumiram dietas com leguminosas.

Quanto ao teor de ácido ribonucléico (RNA) total há também diferença significativa entre as dietas com leguminosas e a controle, como pode ser visto na Tabela 9, onde se observa um aumento de 43,4 e 25,6% do RNA total do intestino delgado, para respectivamente, grupo de animais em dietas com feijão e ervilha, em relação ao grupo com caseína. Esses resultados, juntamente com maior matéria seca e proteína total observados no intestino delgado, podem indicar um aumento no tecido epitelial deste órgão (renovação celular) de ratos alimentados com dietas contendo feijão e ervilha, que pode contribuir para maior excreção de nitrogênio endógeno fecal como sugerido por BENDER & MOHAMMADIHA (1981) e SANDARADURA & BENDER (1983), mas questionado por FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983), que atribuem o aumento do nitrogênio fecal à presença de fibra na dieta e ao nitrogênio de origem bacteriana. CASSIDY et alii (1981) sugerem que alterações na taxa de esfoliação celular do intestino delgado observado em ratos consumindo dietas com celulose, alfafa e pectina seja uma possível consequência nutricional da ingestão de fibra. JALALI (1992) observou um aumento na radioatividade e teor de RNA nas fezes de ratos marcados isotopicamente com ³H-adenosina, em dieta contendo feijão cozido como fonte protéica quando comparado a um grupo controle com caseína; sugerindo maior incorporação do precursor ao RNA das células intestinais, com posterior aumento da descamação destas e sua excreção nas fezes.

Segundo GE & MORGAN (1993), um maior conteúdo de proteínas e RNA são indicadores de hipertrofia celular, já a ocorrência de hiperplasia pode ser

vista através da determinação de DNA, o que não foi proposto para este trabalho. Então, os resultados aqui obtidos (maior teor de proteína e RNA total do intestino delgado), que estão dispostos na tabela 9, podem indicar que as dietas com leguminosas ocasionaram uma hipertrofia das células do intestino delgado. Entretanto, não se pode justificar a elevação na massa do intestino dos animais em dietas com leguminosas, como já mencionado, como resultante somente do aumento no volume das células, podendo também ser consequência de uma provável hiperplasia. SANDARADURA & BENDER (1983) observaram que o aumento no número de células da mucosa intestinal (renovação celular), de ratos que receberam dieta com feijão cozido, foi aproximadamente o dobro daquela observada em dieta com caseína. Esse resultado também foi confirmado quando os autores determinaram o teor de nitrogênio e DNA nas fezes de ratos em dieta de feijão comparado com dieta de caseína.

Por outro lado, para a capacidade de síntese protéica, medida através da relação entre teor de RNA e proteína do intestino delgado (MARTINEZ et alii, 1995), os valores obtidos para os tratamentos não foram estatisticamente diferentes, apesar dos animais com dieta de feijão apresentarem um valor 23,6% e 13,9% maior do que o grupo com caseína e ervilha, respectivamente, como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9 - Proteína, RNA total, capacidade de síntese protéica (RNA /Proteína) e radioatividade total do intestino delgado de ratos em dietas contendo caseína, feijão-comum e ervilha, após seis dias de tratamento

Tratamento	Prot.Total (mg)	DP*	RNA Total (µg)	DP*	RNAxProt. ⁻¹ (µg×mg ⁻¹)	DP*	Radioat. (µCi)	DP*
Caseína	421	31,1	15,9	1,63	37,9	1,68	0,16	0,02
Feijão	493***	55,5	22,8***	3,43	46,8	8,63	0,34***	0,08
Ervilha	491***	28,5	20,0***	1,13	41,1	1,16	0,24***	0,02

Nota: Médias seguidas por *** diferem em relação ao controle (Caseína) pelo Teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05.

* DP: desvio padrão da média de cinco ratos por tratamento.

Com relação à radioatividade do intestino delgado obtida através da administração intraperitoneal de ^3H -uridina e ^3H -desoxicitidina no rato, duas horas antes do sacrifício, pode-se notar que os animais submetidos à dieta com feijão apresentaram uma maior radioatividade seguido pelo grupo com ervilha quando comparado ao controle com caseína. A radioatividade incorporada ao intestino delgado dos ratos em dieta com feijão chegou a ser 112,5% maior do que o grupo com caseína. Já para a dieta com ervilha, a radioatividade foi 50,0% maior em relação ao controle; quando se compara as leguminosas entre si, observa-se que a dieta com feijão foi responsável por 41,7% a mais de radioatividade no ID de ratos.

Considerando que a uridina é nucleosídeo precursor da molécula de RNA e a desoxicitidina do DNA, esses nucleosídeos também podem ser metabolizados no organismo a outros derivados tais como coenzimas, compostos fosfatados de alta energia como UTP (uridina) e CTP (desoxicitidina). Podendo ainda serem transformados em outros nucleosídeos como a uridina que, perdendo seu H da posição 5 (^3H) e dando entrada a um grupo metil, transforma-se em timidina que pode ser incorporada ao DNA, ou ainda a uridina pode ser convertida aos nucleotídeos citidina e desoxicitidina, retendo o ^3H na posição 5, podendo ser incorporado ao DNA (SCHAER et alii, 1969; MARTIN, 1982). Enquanto que a desoxicitidina com a entrada de um radical hidroxila passará para citidina, nucleosídeo precursor do RNA.

FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983) verificaram um aumento de 35% na atividade de ^3H e de DNA na mucosa do intestino delgado de ratos alimentados com feijão cozido injetado intraperitonealmente com ^3H -timidina, comparado ao controle com caseína, sugerindo um moderado aumento na proliferação celular. Porém, segundo esses autores, isto não é devido, necessariamente, ao consumo de feijão, pois essas mudanças também podem ser observadas em animais que ingerem dietas ricas em polissacarídeos não digeríveis. Outros autores também observaram alterações na proliferação celular da mucosa do intestino delgado em animais consumindo fibra alimentar (BROWN et alii, 1979; CASSIDY et alii, 1981; FARNES & SCHENEEMAN, 1982; JACOBS, 1983); entretanto essas mudanças não dependem somente da quantidade mas também da qualidade da fibra presente na dieta (JACOBS, 1983). Já SOUTHON et alii (1985) acreditam que o tamanho

das partículas da parede celular dos vegetais na dieta é importante por seu estímulo mecânico direto sobre a mucosa intestinal causando a elevação na esfoliação celular. Alternativamente, os constituintes da parede celular de vegetais (fibra alimentar) ou talvez os produtos de seu metabolismo pela flora intestinal, podem exercer estímulo bioquímico para divisão celular (efeito trófico).

Dados obtidos no presente estudo indicam aumento na mucosa intestinal, que pode ser verificado tanto pela massa do órgão como pelas determinações bioquímicas de proteína, RNA e pela radioatividade. Como já foi citado anteriormente, outros autores também chegaram aos mesmos resultados usando modelo com ratos ingerindo dietas com feijão cozido (BENDER & MOHAMMADIHA, 1981; FAIRWEATHER-TAIT et alii, 1983; SANDARADURA & BENDER, 1983; JALALI, 1992).

A partir dos resultados obtidos tanto no balanço nitrogenado como também ao nível de mucosa intestinal, pode-se notar que os animais que receberam dieta contendo ervilha comportaram-se de modo diferente em relação aos animais em dieta contendo feijão. O que poderia explicar tal fato é que, possivelmente, a proteína de ervilha tenha melhor qualidade nutricional que a de feijão, verificado através da menor excreção de nitrogênio fecal, maior digestibilidade e valor biológico (HUISMAN et alii, 1992; DOMENE & OLIVEIRA, 1993; AUCÉLIO, 1995), e menor efeito sobre a mucosa intestinal como já discutido neste trabalho. A leguminosa ervilha tem menor teor de fatores antinutricionais e fibra alimentar e melhor qualidade protéica (GRIFFITHS, 1984), quando comparada a outras leguminosas como *Vicia faba* L. e *Phaseolus vulgaris* L. (MARTINEZ et alii, 1995).

4.2.2 - Incorporação de ^3H -triptofano às Secreções Digestivas

Na tabela 10 e figura 5 encontram-se os resultados obtidos neste ensaio relativos à massa corpórea e para matéria seca, proteína e radioatividade total do conteúdo gastrintestinal (estômago e intestino delgado). Nota-se uma diferença significativa para a variável matéria seca do conteúdo gastrintestinal,

sendo que os animais que receberam, via orogástrica, suspensão com farinha de feijão cozido e liofilizado apresentaram maior conteúdo gastrintestinal, seguido pela ervilha, respectivamente 52 e 34% a mais que os animais controle (caseína).

Em relação à proteína total a diferença entre os tratamentos não foi significativa, como pode ser observado na Tabela 10 e figura 5. A quantidade de proteína administrada via orogástrica para os três tratamentos foi idêntica (100 mg); procurou-se também obter a mesma massa por volume para as suspensões através da adição de amido de milho, evitando assim um possível efeito do teor protéico e/ou da quantidade de matéria seca e volume da suspensão administrada, aos ratos, nas secreções digestivas.

Tabela 10 - Massa corporal e, quantidade, teor de proteína e radioatividade total do conteúdo gastrintestinal de ratos obtido duas horas após intubação orogástrica com 100mg de proteínas provenientes de caseína, feijão-comum e ervilha, marcados via intraperitoneal com ^3H -triptofano.

Tratamento	Mas. Corp. (g)	DP*	Cont. Gast. (mg)	DP*	Prot. Total (mg)	DP*	Radioat. (μCi)	DP*
Caseína	72,0	3,35	270	62,2	62,8	19,5	1,08	0,37
Feijão	74,3	4,22	412***	11,7	79,0	6,7	0,64	0,22
Ervilha	71,8	5,53	362***	60,8	64,8	12,2	0,82	0,53

Nota: Médias seguidas por *** diferem em relação ao Controle (Caseína) pelo Teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05.

* DP: desvio padrão para média de seis animais por tratamento.

Segundo CORRING et alii (1989), o volume da refeição, a quantidade de proteína (TWOMBLY & MEYER, 1961), ou ainda se essa é intacta ou proteolisada, o teor de amido e gordura e, até mesmo a presença de fibra ou de algum outro fator antinutricional na dieta, pode levar a alterações nas secreções digestivas, principalmente pancreática. Entretanto, o tempo para adaptação pancreática à mudanças na dieta pode levar 24 horas de acordo com DAGON & LAHAIE (1981) ou de 5 a 7 dias como proposto por BOZKURT & HABERICH (citados por CORRING et alii, 1989). Por outro lado, no presente experimento, não foi feita nenhuma adaptação prévia do organismo ao alimento administrado, uma vez que os animais foram sacrificados duas horas após intubação orogástrica com

as suspensões em estudo. O maior volume do quimo gastrintestinal encontrado para os ratos que receberam suspensão com leguminosa pode indicar tanto um esvaziamento gástrico mais lento em relação a caseína como verificado por OLIVEIRA et alii (1988), como também uma menor digestibilidade e absorção dos nutrientes presentes nestas leguminosas.

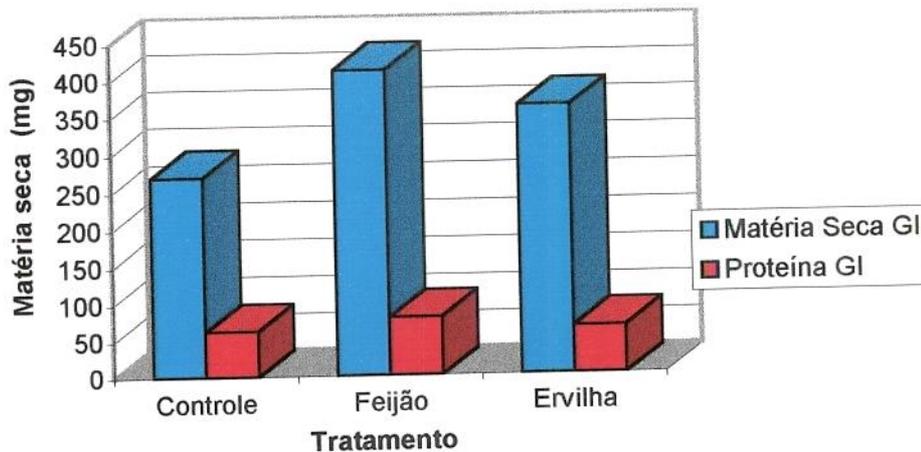


Figura 5 - Matéria seca e quantidade de proteína total do conteúdo gastrintestinal de ratos, duas horas após intubação orogástrica com 4 ml de suspensão protéica (100 mg proteína) de caseína (controle), feijão-comum ou ervilha.

De acordo com LOW (1990) o tamanho das partículas do alimento, a viscosidade, a osmolaridade e a presença de ácidos orgânicos e graxos, proteínas ou aminoácidos e açúcares (principalmente amido e polissacarídeos não digeríveis), interferem no esvaziamento gástrico. Quanto ao tamanho das partículas das suspensões utilizadas, tentou-se homogeneizá-las passando por um tamis a 100 mesh. As suspensões de leguminosas apresentaram-se mais viscosas do que a de caseína, devido a maior solubilidade da proteína de feijão e ervilha em solução salina a 0,9%, sabendo-se que a maior fração protéica dessas leguminosas é a globulina (altamente solúvel em solução salina diluída), que corresponde de 40-60% da proteína total em feijões (OSBORN, citado por REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993) e ervilhas (GUEGUEN & BARBOT, 1988); e também à presença de fibra solúvel como pectina e goma da própria semente (HUGHES, 1991), o que não se encontrava na suspensão com caseína.

Em relação a ácidos graxos, as leguminosas como o feijão e ervilha têm um baixo teor, em torno de 2 a 3%. (DOMENE, 1990; AUCÉLIO, 1995). Portanto, o que poderia estar implicado no possível esvaziamento mais lento para leguminosas é a maior viscosidade da suspensão e a presença de material indigerível como fibra alimentar (LEEDS, 1982). Durante o tratamento térmico podem ocorrer reações do tipo Maillard ou complexação de várias substâncias presentes nas sementes de leguminosas, o que faz com que as mesmas sejam mais lentamente digeridas pela dificuldade das enzimas digestivas em se ligar aos seus sítios de ação no alimento.

Existem evidências de que as fibras alimentares e seus derivados podem exercer efeitos agudos e crônicos sobre a biodisponibilidade de nutrientes no trato gastrintestinal. Como efeito agudo, as fibras viscosas com pectina e goma guar podem interagir diretamente com as enzimas digestivas, seus derivados também afetam absorção de nutriente, talvez por se associarem a superfície da mucosa interferindo no transporte de nutrientes (SOUTHGATE, citado por CALVERT et alii, 1985). Segundo LEEDS (1982), isto é ocasionado por vários mecanismos, dentre os quais incluem efeitos sobre pH gástrico e intestinal, esvaziamento gástrico, tempo de trânsito intestinal e composição do conteúdo luminal. Os resultados obtidos por CALVERT et alii (1985) utilizando modelos com ratos, os quais receberam dieta basal acrescida de fibra alimentar, confirmam que essa substância quando presente na dieta pode interferir no processo normal de digestão e absorção de nutrientes orgânicos via efeito intraluminal mais do que a diminuição absoluta da atividade enzimática da superfície dos vilos.

A proteína encontrada no lúmen gastrintestinal é uma mistura de proteína alimentar com as de origem endógena (secreções digestivas, descamações da mucosa intestinal, bactérias da flora intestinal, etc). Segundo NASSET & JU (1961) e NASSET (1965), a proteína exógena no intestino delgado é misturada várias vezes com a proteína endógena, chegando a diluição de 4 vezes (cães) a 6-7 vezes (ratos) como foi verificado por NASSET & JU (1961), através da intubação gástrica com caseína marcada em cães e ratos.

No presente estudo os valores obtidos para proteína total (alimentar mais endógena) foram semelhantes para os três tratamentos (Tabela 10 e figura 5),

apesar da variabilidade individual do animal dentro do mesmo tratamento. Lamentavelmente, não foi possível separar o nitrogênio endógeno do exógeno neste experimento, não se podendo, desde modo, fazer qualquer sugestão a respeito da participação efetiva do nitrogênio endógeno para nitrogênio total encontrado no trato gastrintestinal (estômago e intestino delgado). Entretanto, OLIVEIRA et alii (1988) verificaram, em ratos intubados via orogástrica com feijão enriquecido com ^{15}N ou proteína isolada, que a diluição isotópica duas horas após intubação indica uma maior proporção de nitrogênio endógeno (41-73%) no estômago de ratos que receberam proteína de feijão comparado com 5% para ratos intubados com caseína. Enquanto que, para o intestino delgado não foi encontrado nenhuma diferença na proporção nitrogênio endógeno e total entre os ratos que receberam proteína de feijão ou caseína. Devido à quantidade mínima de quimo gástrico recuperado duas horas após a intubação, este foi adicionado ao conteúdo intestinal, para se obter um volume que permitisse as análises bioquímicas e de radioatividade propostas.

Para obter a radioatividade do conteúdo gastrintestinal, os animais foram injetados, via intraperitoneal, com ^3H -triptofano duas horas antes do sacrifício, com o objetivo de marcar as enzimas digestivas. De acordo com HANSSON & BLAU (citados por OCHOA-SOLANO & GITLER, 1968), aminoácidos radioativos injetados via intravenosa, são rapidamente incorporados às proteínas do pâncreas, aparecendo proteína marcada nas secreções pancreáticas dentro de uma a duas horas após injeção do aminoácido marcado. O triptofano é um aminoácido essencial e está presente nas enzimas digestivas mas, por outro lado, esse aminoácido pode ser metabolizado no organismo a outros compostos como o neurotransmissor serotonina, a vitamina niacina ou ainda utilizado para produção de energia via ciclo de Krebs (VOET & VOET, 1990). Espera-se que o ^3H -triptofano tenha sido incorporado preferencialmente às secreções enzimáticas do rato, pois o tempo entre administração do radioisótopo e o sacrifício do animal foi de duas horas, muito pequeno para que o aminoácido marcado fosse incorporado aos tecidos epiteliais da mucosa gastrintestinal e perdido para luz do estômago e/ou do intestino delgado como parte das células descamadas. Mas esse aminoácido pode também ter sido utilizado para sintetizar outras proteínas ou como precursor de outras substâncias como citado anteriormente.

Relacionando os valores encontrados para proteína do conteúdo GI com a radioatividade obtida para a mesma amostra, nota-se que os tratamentos tiveram respostas semelhantes, não diferindo estatisticamente para as duas variáveis estudadas (Tabela 10). É importante ressaltar a grande variabilidade apresentada pelos animais para a variável radioatividade, como pode ser visto pelo alto desvio padrão. O que poderia justificar essa variabilidade nos valores obtidos dentro do mesmo tratamento é a variação na resposta individual de cada animal ao radioisótopo administrado, ou ainda a uma possível alteração no volume do radioisótopo injetado de ordem técnica como a seringa utilizada (seringa para insulina marca B-D, com divisões de 100 μ L) juntamente com o pequeno volume do radioisótopo administrado (150 μ L por animal), podendo interferir na radioatividade medida no animal, qualquer microgota que ficasse perdida no pelo do animal ou mesmo na seringa utilizada.

Entretanto quando se analisa esses dados de radioatividade num gráfico (figura 6), pode-se notar que os animais intubados com caseína, apresentaram maior incorporação de ^3H -triptofano às secreções digestivas, inferido através da maior radioatividade encontrada nesse tratamento, seguido pela ervilha e feijão-comum.

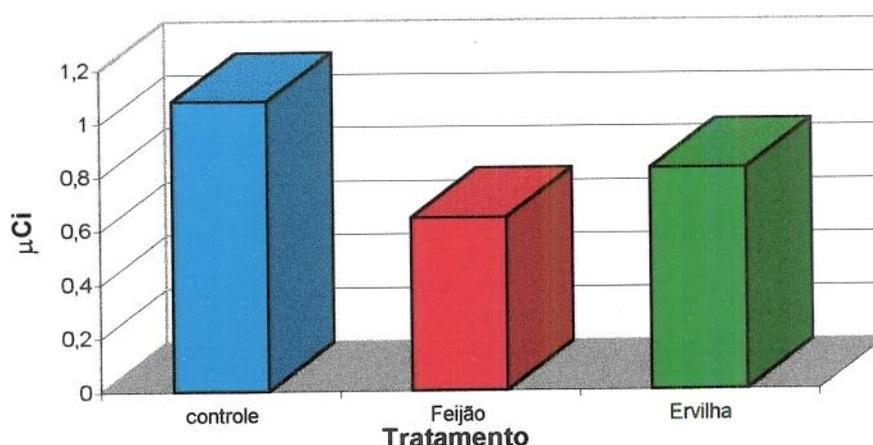


Figura 6 - Radioatividade média do conteúdo gastrointestinal de ratos duas horas após intubação orogástrica em 4 ml de suspensão protéica (100 mg de proteína) de caseína (controle), feijão-comum ou ervilha.

OCHOA-SOLANO & GITLER (1968) isolaram uma apreciável quantidade de proteína endógena, peptídeos e aminoácidos marcados com ³⁵Se-metionina, do estômago e do último segmento do intestino delgado de ratos injetados intravenosamente com metionina radioativa duas horas antes da alimentação.

Para verificar se a maior radioatividade encontrada é seguida pelo maior teor de proteína total do quimo gastrintestinal foi feita análise de correlação simples entre os valores obtidos para a radioatividade e proteína total nos três tratamentos. Observando a tabela 10, nota-se que os ratos intubados com suspensão de feijão apresentaram maior conteúdo de proteína total no quimo gastrintestinal, mas não foi seguido pelo aumento de radioatividade, o que é confirmado pela análise de correlação levemente negativa entre essas duas variáveis ($r = -0,11681$), sugerindo que um maior teor protéico encontrado no conteúdo gastrintestinal pode ser proteína alimentar não digerida ou não absorvida. Enquanto que a resposta dos animais que receberam caseína foi inversa, havendo correlação positiva ($r = 0,70422$) entre proteína total e radioatividade, indicando digestão mais rápida da proteína da caseína do que das leguminosas (feijão-comum e ervilha) estudadas, a maior radioatividade encontrada sugere que no conteúdo gastrintestinal de ratos entubados com caseína há mais proteína endógena do que exógena quando comparado com animais que receberam feijão. A outra leguminosa estudada (ervilha) comportou-se de maneira semelhante à caseína, apresentando uma fraca correlação positiva ($r = 0,1941$) entre as variáveis proteína e radioatividade total do conteúdo gastrintestinal. A partir desses resultados pode-se sugerir que a proteína de ervilha é mais rapidamente hidrolisada e absorvida do que a de feijão. NEWPORT (1979) e PROTEIN digestion ... (1979) verificaram o aparecimento de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) no conteúdo gástrico mais rápido para proteínas do leite do que para proteína de peixe ou soja.

A partir dos resultados obtidos neste experimento, pode-se sugerir que o nitrogênio total elevado no conteúdo gastrintestinal para o grupo tratado com feijão, não é necessariamente de origem endógena se comparado aos resultados obtidos para caseína, isto é, as leguminosas não exerceram nenhum efeito sobre

um provável aumento nas secreções digestivas. Sabe-se que sementes de leguminosas utilizadas em estado cru induzem maior secreção de enzimas digestivas (SGARBIERI et alii 1982; OLIVEIRA et alii, 1988), principalmente pancreáticas, devido à presença de fatores antinutricionais como inibidores de tripsina e quimotripsina, nestas sementes. Entretanto, neste experimento, utilizou-se sementes cozidas, onde esses fatores antinutricionais se encontram inativados, não podendo exercer qualquer efeito sobre as secreções digestivas. Por outro lado, outros fatores como presença de proteína intacta ou de peptídeos, tipo de proteína, teor e tipo de fibra alimentar podem exercer importante influência nas secreções digestivas e na excreção fecal de nitrogênio endógeno (SKILTON et alii, 1988).

Relacionando os resultados obtidos neste ensaio com aqueles encontrados no primeiro, no qual se verificou que, através de medida de matéria seca, dados bioquímicos (RNA e proteína total) e pela radioatividade (incorporação de nucleosídeos marcados aos ácidos nucléicos) do intestino delgado, os ratos submetidos às dietas cuja fonte protéica são leguminosas no estado cozido, apresentaram maior renovação celular, conseqüente maior esfoliação celular do epitélio intestinal do que os animais controle (que receberam dieta contendo caseína). Então, pode-se sugerir que, a maior excreção fecal de nitrogênio endógeno em ratos alimentados com leguminosas cozidas é devido a elevada descamação das células da mucosa intestinal e, que as leguminosas cozidas não exercem nenhum estímulo sobre as secreções digestivas em ratos, como verificado no segundo ensaio.

Sabendo-se que a proteína endógena que está sendo perdida pelas fezes de animais que consomem dietas com leguminosas é de alta qualidade e, que a proteína dessas leguminosas têm baixo valor nutricional, destaca-se a real importância da relação entre proteína endógena perdida e alimentar absorvida, para uma população que tem como hábito uma dieta variada, mas que na sua maioria tem como principal fonte protéica sementes de leguminosas, principalmente os feijões.

5 - CONCLUSÕES

A partir das análises dos resultados obtidos nos dois ensaios propostos, pode-se concluir que:

1- Os dados obtidos referentes ao teor de proteína e RNA total, juntamente com a radioatividade incorporada aos ácidos nucleicos da mucosa do intestino delgado, indicam maior atividade celular da mucosa do intestino delgado de ratos alimentados com dietas contendo feijão-comum e ervilha como fonte protéica, quando comparados a ratos em dieta cuja fonte protéica é caseína (grupo controle).

2- Não há indícios de que leguminosas (feijão-comum e ervilha) ingeridas em estado cozido tenham algum efeito estimulatório sobre as secreções digestivas.

3- A proteína da caseína é mais rapidamente hidrolisada e absorvida do que as das leguminosas estudadas.

4- Comparando as leguminosas entre si nota-se que, a proteína da ervilha tem melhor valor nutricional e é digerida e absorvida mais rapidamente do que a de feijão-comum. A dieta contendo ervilha também exerceu menor efeito sobre a atividade celular da mucosa intestinal quando comparada com o feijão-comum.

5 - As conclusões obtidas no presente trabalho, permitem inferir indiretamente que o aumento na excreção fecal de nitrogênio endógeno, usualmente observado em ratos mantidos em dietas contendo leguminosas como

fonte protéica, é devido à elevada descamação do epitélio intestinal, do que a um possível efeito estimulatório sobre as secreções digestivas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ACEVEDO, E.; VELAZQUE-CORONADO, L.; BRESSANI, R. Change in dietary fiber content and its composition as affected by processing of black beans (*Phaseolus vulgaris*, Tamazulapa variety). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dorchecht, v.46, n.2, p.139-145, September, 1994.
2. AHMED, A.E.; SMITHARD, R.; ELLIS, M. Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.65, n.1, p.189-197, July, 1991.
3. ALZUETA, C.; TREVIÑO, J.; ORTIZ, L. Effect of tannins from faba beans on protein utilisation in rats **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.59, n.4, p.551-553, .1992.
4. ANDERSON, I.W.; GUSTAFSON, N.J.; SPENCER, D.B.; TIETYEN, J.; BRYAN, C.A. Serum lipid response of hypercolesterolemic men to single and divided doses of canned bean. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.51, n.6, p.1013-1016, 1990.
5. ARTZ, W.E.; BISHOP, P.D.; DUNKER, A.K.; SCHANUS, G.; SWANSON, B.G. Interaction of synthetic proanthocyanidin dimer and trimer with bovine serum albumin and purified bean globulin fraction G-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.35, n.3, p.417-421, May/June, 1987.
6. ASP, N. G., JOHANSSON, C. G., HALLMER, H., SILJESTROM, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.476-482, May/June, 1983.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 14 ed, Williams, s. ed., p.156-157, 1984.

8. AUCÉLIO, P.Q. **Efeito de fatores genéticos e edafoclimáticos sobre a composição centesimal e valor nutricional de 5 cultivares de ervilha (*Pisum sativum* L.) introduzidas em 4 microregiões do Estado de São Paulo.** Campinas, 1995. 126p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
9. AW, T-L. & SWANSON, B.G. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.1, p.67-71, January/February., 1985.
10. BENDER, A. E. & MOHAMMADIHA, H. Low digestibility of legume nitrogen. **Proceedings Nutrition Society**, Cambridge, v.40, p.66A, 1981.
11. BISHNOI, S. & KHETARPAUL, N. Protein digestibility of vegetables and field peas (*Pisum sativum*): varietal differences and effect of domestic processing and cooking methods. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dorchecht, v.46, n.1, p.71-76, July, 1994.
12. BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
13. BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; BRAHAM, J.E. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins.. **Journal of Plant Foods**, London, v.4, n.1, 43-55, 1982.
14. BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; VALIENTA, A.T. Effect of cooking and of amino acid supplementation in the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris*). **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.17, n.1, p.69-78, January, 1963.
15. BROWN, R.C.; KELLEHER, J.; LOSOWSKY, M.S. The pectin on the struture and function of the rat small intestine. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.42, n.3, p.357-365, november, 1979.

16. BUTTS, C.A.; MOUGHAN, P.J.; SMITH, W.C. Protein nitrogen, peptide nitrogen and free amino acid nitrogen endogenous digesta nitrogen at the terminal ileum of the rat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.59, n.3., p.291-298, 1992.
17. CALVERT, R.; SCHNEEMAN, B.O.; SATCHITHANANDAM, S.; CASSIDY, M.M.; VAHOUNU, G.V. Dietary fiber and intestinal adaptation: effects on intestine and pancreatic digestive enzyme activities. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.41, n.6, p.1249-1256, June, 1985.
18. CARPENTER, K.J. The nutritional contribution of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) in perspective. **Food Technology**, Chicago, v.35, n.3, p.77, March, 1981.
19. CASSIDY, M.M.; LIGHTFOOT, F.G.; GRAU, L.E.; STORY, J.A.; KRITCHEVSKY, D.; VAHOUNY, G.V. Effect of chronic intake of dietary fibers on the ultrastructural topography of rat jejunum and colon: a scanning electron microscopy study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.34, n.2, p.218-228, February, 1981.
20. CHANG, K.G. & SATTERLEE, L. Isolation and characterization of the major protein from Great Northern beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of food Science**, Chicago, v.46, n.5, p.1368-1373, September/October, 1981.
21. COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. 2.ed. New York: Wiley, 1957.
22. CORRING, T.; JUSTE, C.; LHOSTE, E. Nutritional regulation of pancreatic and biliary secretions. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.2, p.161-180, 1989.
23. CORRING, T.; SAUCIER, R. Secretion pancréatique sur porcs fistulés. Adaptation à la teneur en protéines du régime (Pancreatic secretion in the fistulated pig. Adaptation to the diet protein content.). **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, Paris, v.12, p.233-241, 1972.

- 24.DA COSTA, L.R.; CROFT, D.N.; CREAMER, B. Protein loss and cell from the small intestine mucosa. **Gut**, London, v.12, n.3, p.179-183, March, 1971.
- 25.DAGON, J.C.; LAHAIE, R.G. Dietary regulation of pancreatic synthesis .I Rapid and specific modulation of enzyme synthesis by changes in dietary composition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.654, n.1, p.111-118, June, 1981.
- 26.DECUYPÉRE, J.A.; KNOCKAERT, P.; HENDERIICKX, H.K. In vitro and in vivo protein digestion in pigs fed diets containing soyabean protein isolates with different physical properties. **Journal of Animal Science**, Campaing, v.53, p.1297-1308, 1981.
- 27.DESHPANDE, S.S.; NIELSEN, S.S. In vitro digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: The role of heat-stable protease inhibitors. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1330-1334, September/October, 1987.
- 28.DESHPANDE, S.S.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Dry bean of Phaseolus: a review. Part 3, CRC, **Critical Review Food Science Nutrition**, Florida, v.21, n.1, p.137-143, 1985.
- 29.DESHPANDE, S.S.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K.; CORNFORTH, D.P. Effect of dehulling on phytic acid, polyphenols and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.6, p.1846-1850, November/December., 1982.
- 30.DOMENE, S.M.A **Estudo do valor nutritivo da proteína de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.), Ervilha (*Pisum sativum* L.) e grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) utilizando marcação isotópica com nitrogênio 15.** Campinas, 1990. 138p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 31.DOMENE, S.M.A. & OLIVEIRA, A.C. The use of nitrogen-15 labeling for the assessment of leguminous protein digestibility. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.39, n.2, p.47-53, April, 1993.

- 32.DREISBACH, L.; NASSET, E.S. Absorption of carbohydrate and protein as affected by feeding cornstarch, banana, or glucose. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.53, n.1, p.523-532, May/August, 1954.
- 33.EASTWOOD, G.L. Gastrointestinal epithelial renewal. **Gastroenterology**, New York, v.72, n.5, p.962-975, May, 1977.
- 34.ECKNAUER, R.; SIRCAR, B.; JOHNSON, L.R. effect of dietary bulk on small intestine morphology and cell renewal in the rat. **Gastroenterology**, New York, v.81, n.4, p.781-786, April, 1981.
- 35.ELIAS, L.G.; DE FERNANDEZ, D.G.; BRESSANI, R. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean products. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.2, p.524-527, March/April, 1975.
- 36.EVANS, M.; BOULTER, D. Crude protein and sulfur amino acid contents of some commercial varieties of pea and beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.31, n.3, p.238-242, March, 1980.
- 37.FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; GEE, J.M.; JOHNSON, I.T. The influence of cooked kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) on intestinal cell turnover and faecal nitrogen excretion in the rat. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.49, n.1, p.303-312, July, 1983.
- 38.FARNESS, P.L.; SCHNEEMAN, B.O. Effects of dietary cellulose, pectin and oat bran on the small intestine in the rat. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.112, n.7, p.1315-1319, July, 1982.
- 39.GARLICK, P.J. A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [³H] phenyllalanine. **Biochemical Journal**, London, v.192, n.2, p.719-723, November, 1980.
- 40.GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J.; JAMES, W.P.T.; WATERLOW, J.C. The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.414, p.71-84, 1975.

41. GE, Y.C. & MORGAN, R.G.H. The effect of trypsin inhibitor on the pancreas and small intestine of mice. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.70, n.1, p.333-345, July, 1993.
42. GOENA, M.; MARZO, F.; FERNANDEZ-GONZALEZ, A.L.; TOSAR, A.; FRUHBECK, G.; SANTIDRIAN, S. Effect of protein the raw legume *Vicia faba* metabolism on muscle and liver in growing rats. **Revista Española de Fisiología**, Pamplona, v.45, p.55-60, 1989. Suplemento.
43. GONÇALVES, J.S. Mercado de Produtos _ feijão. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.26, n.8, p.37-41, Agosto, 1996. Separata.
44. GRANT, G.; DORWARD, P.M.; BUCHAN, W.; CARMOUR, J.; PUSZTAI, A. Consumption of diets containing raw soya beans (*Glycine max*), kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), cowpeas (*Vigna unguiculata*) or lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days: effects on body composition and organ weights. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.73, n.1, p.17-29, January, 1995.
45. GREEN, G.M.; LEVAN, V.H.; LIDDLE, R.A. Plasma cholecystokinin and pancreatic growth during adaptation to the diet. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v.251, n.1, p.G70-G74, July, 1986.
46. GREEN, G.M.; NASSET, E.S. Role of dietary protein in rat pancreatic enzyme secretory response to a meal. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.113, n.11, p.2245-2252, November, 1983.
47. GREER, F.; BREWER, A.C.; PUSZTAI, A. Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.54, n.1, p.95-103, July, 1985.
48. GRIFFITS, D.W. The polyphenolic content and enzyme inhibitory activity of testa from bean (*Vicia faba*) and pea (*Pisum spp*) varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.32, n.4, p.797-804, 1981.

49. GRIFFITHS, W.D. & MOSELEY, G. The effect of diet containing field beans of high or low polyphenolic content on the activity of digestive enzyme in the intestines of rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.31, n.3, p.255-259, March., 1980.
50. GRIFFITHS, D.W. The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various pea (*Pisum spp*) and field bean (*Vicia faba*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.35, n.5, p.481-486, May, 1984.
51. GRIMBLE, G.K.; SILK, D.B.A. Peptides in human nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.2, p.87-108, 1989.
52. GUEGUEN, J. & BARBORT, J. Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.42, n.3, p.321-329, 1988.
53. HARMUT-HOENE, A.E.; SCHWERDTFEEGER, E. Effect of indigestible polysaccharides on protein digestibility and nitrogen retention in growing rats. **Nutrition and Metabolism**, Basel, v.23, n.5, p.399-407, May, 1979.
54. HERBERT, D.; PHIPPS, P.J.; STRANGE, R.E. Chemical analysis of microbial cells. In: NORRIS, J.R. & RIBBORS, P.W. **Methods of Microbiology**. London, Academic Press, 1971. v.5B, cap.3.
55. HOWARD, F.; YUDKIN, S. Effects of dietary change upon the amylase and tripsin activities of the rat pancreas. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.17, p.281-295, 1963.
56. HUGHES, J.S. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.9, p.122-126, September, 1991.
57. HUISMAN, J.; VAN DER POEL, A.F.B.; MOUWEN, J.M.V.M.; VAN WEERDEN, E.J. Effect of variable protein contents in diet containing *Phaseolus vulgaris* beans on performance, organ weights and blood variables in piglets, rats and chickens. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.61, n.3, p.755-764, May, 1990.

58. HUISMAN, J.; HEINZ, T.H.; VAN DER POEL, A.F.B.; VAN LEEUWEN, P. True protein digestibility and amounts of endogenous protein measured with the ¹⁵N-dilution technique in piglets fed on peas (*Pisum sativum*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*). **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.68, n.1, p.101-110, July., 1992.
59. JACOBS, L.R. Effects of dietary fiber on mucosal growth and cell proliferation in the small intestine of the rat: a comparison of oat bran, pectin, and guar with total fiber deprivation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.37, n.6, p.954-960, June, 1983.
60. JAFFÉ, W.G. Leguminosas para consumo humano. Ventajas e desventajas. **Revista de la Facultad del Agronomía**, Maracay, v.35, p.87-95, 1986.
61. JALALI, V.R.R. Utilização de ³H-aminoácidos e ³H-nucleosídeos para estudar perdas endógenas de nitrogênio em ratos alimentados com dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Campinas, 1992. 186p. Tese (Doutor em Ciência da Nutrição)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
62. JANSMAN, A. J. M.; ENTING, H.; VERSTEGEN, M. W.A.; HUISMAN, J. Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba*, L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.71, n.4, p.627-641, April., 1994.
63. JOHNSON, L.R. Regulation of gastrointestinal growth. In: JOHNSON, L.R., editor. **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York: Raven press, 1987. p.301-333.
64. IKEGAMI, S.; TSUCHIHASHI, F.; HARADA, H.; TSUCHIHASHI, N.; NISHIDE, E.; INNAMI, S. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.120, n.4, p.353-369, April, 1990.

65. KADAM, S.S.; SMITHARD, R.R.; EYRE, M.D.; ARMSTRONG, D.G. Effects of heat treatments of antinutritional factors and quality of proteins in winged bean. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.39, n.3, p.267-275, 1987.
66. KING, T.P.; BEGBIE, R.; CADENHEAD, A. Nutritional toxicity of raw kidney beans in pigs. Immunocytochemical and cytopathological studies on the gut and the pancreas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.34, n.12, p.1404-1412, December, 1983.
67. KLEIN, R.M.; MCKENZIE, J.C. The role of cell renewal in the ontogeny of the intestine. 1 Cell proliferation patterns in adult, fetal, and neonatal intestine. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Hagerstown, v.2, n.1, p.10-43, 1983.
68. LEEDS, A.R. Modification of intestinal absorption by dietary fibers and fiber components. In: VAHNOUNY, G.V.; KRITCHESKY, D.; eds. **Dietary fiber in health and disease**. New York: Plenum Press, 1982. p.53-71, 1982.
69. LEEDS, A.R.; KHUMALO, T.D.; NDABA, N.G.; LINCOLN, D. Haricot beans, transit time and stool weight. **Journal of Plant Food**, London, v.4, n.1, p.33-41, 1982.
70. LEES, R. **Manual de analisis de alimentos**. Traduzido por andres Marcos Barrado. Zaragoza: Acribia, p.17, 124-125, 1979. (Laboratory handbook of methods of food analysis).
71. LIDDLE, R.A.; GREEN, G.M.; CONRAD, C.K.; WILLIAMS, J.A. CCK response to food is species specific fat and amino acids do not stimulate. CCK release in the rat. **Gastroenterology**, New York, v.88, n.5, p.1476, abst., May, 1985.
72. LOW, A.G. Studies on digestion and absorption in the intestines of growing pigs. 6 Measurements of the flow of nitrogen. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.41, n.1, p.137-146, January, 1979.

73. LOW, A.G. Nutritional regulation of gastric secretion, digestion and emptying. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.3, p.229-252, 1990.
74. LYNCH, C.S.; RHA, C.K.; CATSIMPOOLAS, N. Tryptic hydrolysis of glycinin and its subunits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.28, n.11, p.971-979, November, 1977a.
75. LYNCH, C.S.; RHA, C.K.; CATSIMPOOLAS, N. Note on the rapid proteolysis of glycinin by pepsin and trypsin. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.54, n.6, p.1282-1285, November/December, 1977b.
76. MANAN, F.; HUSSAIN, T.; ALLI, I.; IQBAL, P. Effect of cooking on phytic acid content and nutritive value of Pakistani peas and lentils. **Food Chemistry**, Essex, v.23, n.2, p.81-87, 1987.
77. MARQUEZ, U.M.L.; LAJOLO, F.M. Nutritional value of cooked beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) and their isolated major protein fractions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Cambridge, v.53, n.7, p.235-242, July., 1990.
78. MARQUEZ, U.M.L. & LAJOLO, F.M. In vivo digestibility of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of endogenous protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.39, n.7, p.1211-1215, july., 1991.
79. MARTIN, D.W., Jr. Metabolismo dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos. In: HARPER, H.A; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A., eds. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1982. p.478-498.
80. MARTINEZ, J.A.; MARCOS, R.; MACARULLA, M.T.; LARRALDE, J. Growth, on ta hormonal status and protein turnover in rats fed diet containing peas (*Pisum sativum* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.47, n.3, p.211-220, April., 1995.
81. MASON, V.C. Metabolism of nitrogenous compounds in the large gut. **Proceeding of the Nutrition Society**, Cambridge, v.43, n.1, p.45-53, 1984.

82. McNURLAN, M.A.; TOMKINS, A.M.; GARLICK, P.J. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. **Biochemical Journal**, London, v.178, n.3, p.373-379, 1979.
83. McPHERSON, L. Effects of the consumption of fully cooked red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) on the growth rate of rats and the morphology of the gut wall. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v.57, n.4, p.611-621, 1991.
84. MEHANSHO, H.; BUTLER, L.G.; CARLSON, D.M.; Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, inductions, and defense mechanisms. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.7, p.423-440, 1987.
85. MÉNDEZ, M.H.M.; DERIVI, S.C.N.; FERNANDES, M.L.; OLIVEIRA, A.M.G. Insoluble dietary fiber of grain food legumes and protein digestibility. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v.43, n.1, p.66-72, enero/febrero, 1993.
86. MITJAVILLA, S.; LACOMBE, C.; CARRERA, G.; DERACHE, R. Effect of tannic acid and oxidised tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.107, n.12, p.2113-2121, December, 1977.
87. MONTGOMERY, D.C. **Design analysis of experiments**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1991. 649p.
88. MOSELEY, G. & GRIFFITHS, W. Varietal variation in the anti-nutritive effects of field beans (*Vicia faba*) when fed to rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.30, n.8, p.772-778, August, 1979.
89. MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds; a reappraisal of its definition and determination; variation according to species and to seed protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.1, p.18-24, January., 1990.

90. MOUGHAN, P.L.; BUTTERY, P.J.; ESSEX, C.P.; SOAR, J.B. Evaluation of the isotope dilution technique for determining ileal endogenous nitrogen excretion in the rat. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v.58, n.2, p.165-172, February., 1992.
91. MUNRO, N. The determination of nucleic acids. **Methods in Biochemical Analysis**. New York, v.14, p.113-175, 1966.
92. NASSET, E.S. & JU, J.S. Mixture of endogenous and exogenous protein in the alimentary tract. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.74, n.4, p.461-465, August, 1961.
93. NASSET, E.S. Role of the digestive system in protein metabolism. **Federation Proceedings**, Bethesda, v.24, p.953-958, July/August., 1965.
94. NEWPORT, M.J. Artificial rearing of pigs 9 Effect of replacement of dried skim-milk by fish concentrate on performance and digestion of protein. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.41, n.1, p.103-110, January, 1979.
95. NIELSEN, S.S. Digestibility of legume proteins. **Food Technology**, Oregon, v.45, n.9, p.112-118, September., 1991.
96. OCHOA-SOLANO, A. & GITLER, C. Digestion and absorption of ingested and secreted proteins labeled with ⁷⁵Se-selenomethionine and ³⁵S-methionine in the gastrointestinal tract of the rat. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.94, n.2, p.249-255, February, 1968.
97. OLIVEIRA, A.C. & SGARBIERI, V.C. Perda de nitrogênio endógeno de ratos em dietas de feijão. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.36, p.887, 1984. Suplemento.
98. OLIVEIRA, A.C. & SGARBIERI, V.C. The influence of rat endogenous nitrogen excretion on the assessment of bean protein quality. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.32, n.4, p.425-436, August., 1986a.

99. OLIVEIRA, A.C. & SGARBIERI, V.C. Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*) on the rat excretion of endogenous nitrogen. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.116, n.12, p.2387-2392, December, 1986b
100. OLIVEIRA, A.C.; SGARBIERI, V.C.; VICTÓRIA, R.L.; CERRI, C.C. Avaliação biológica de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) utilizando carbono 14 e nitrogênio 15. In: LAJOLO, F.M. & MARQUEZ, U.M.L., eds. **Advances in bean reseach; chemistry, nutrition and technology**. São Paulo, University of São Paulo, p.35-43, 1988.
101. PAK, N.; AYALA, C.; VERA, G.; PENNACCHIOTTI, I.; ARAYA, H. Soluble and insoluble dietary fiber in cereals and legumes cultivated in Chile. **Archivos Latinoamericano del Nutricion**, Caracas, v.40, n.1, p.116-121, Marzo, 1990.
102. PARTRIDGE, I.G.; LOW, A.G.; SAMBROOK, I.E.; CORRING, T. The influence of diet on the exocrine pancreatic secretion of growing pigs. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.48, n.1, p.137-145, July, 1982.
103. PAULL, A.A.; SOUTHGATE, D.A.T. **The composition of food**. Med. London: Elsevier/Holand Biomedical Press, 1978.
104. PEARSON, D. **Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos**. Zaragoza, Acribia, p.41-71, 1976. (Laboratory techniques in food analysis).
105. PELLET, P.L. & YOUNG, V.R. (Editors) **Nutritional evaluation of protein foods**. The United Nations University, Tokyo, p.62, 1980.
106. PROTEIN digestion and absorption measured by re-entrant cannula in the pig. **Nutrition Reviews**, New York, v.37, n.5, p.149-150, May, 1979.
107. PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W.; GRANT, G.; KING, T.P. The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.32, n.10, p.1037-1046, October, 1981.

- 108.QUASTLER, H. & SHERMAN, F.G. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. **Experimental Cell Research**, New york, v.17, p.420-428, 1959.
- 109.REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-1976A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, November., 1993.
- 110.REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Dry bean tannins: a review of nutritional implications. **Journal of Americam Oil Chemistry Society**, Dallas, v.62, n.3, p.541-549, March, 1985.
- 111.REYES-MORENO, C. & PAREDES-LÓPEZ, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans __ A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Florida, v.33, n.3, p.227-286, 1993.
- 112.R.J. HARVEY INSTRUMENT CORPORATION. **Biological material oxidizer OX-500, Operating & service manual**. New Jersey, 1990. p.7-11. (an automated "Robot controllable" system for the preparation of biological samples for liquid scintillation counting).
- 113.ROMERO, S.; RYAN, D.S. Susceptibility of the storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* L., to in vitro enzymatic hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.26, n.4, p.784-788, July/August, 1978.
- 114.ROY, J.H.B.; STOBO, I.J.F.; SHOTTON, S.M.; GANDERTON, P.; GILLIES, C.M. The nutritive value of milk proteins for preruminant calf. The effect of replacent of milk protein by soya-bean flour or fish-protein concentrate. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.38. n.2, p.167-187, September, 1977.

- 115.SAHARAN, K. & KHETARPAUL, N. Biological utilization of vegetable peas: effect of cooking and varietal differences. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.45, n.4, p.321-329, June, 1994.
- 116.SANDARADURA, S.S.; BENDER, A.E. The effect of cooked legumes on mucosal cell turnover in the rat. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.43, p.89A, 1983.
- 117.SAKATA, T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.58, n.1, p.95-103, July, 1987.
- 118.SCHAER, J.C.; GRIEDER, A.; HEINIGER, H.J.; SCHINDLER, R. Comparison of 3H-cytidine and 3H-uridine as precursors of RNA. **Experimental Cell Research**, New York, v.56, n.2-3, p.449-452, August, 1969.
- 119.SEMINO, G.A.; RESTANI, P.; CERLETTI, P. Effect of bound carbohydrate on the action of trypsin on lupin seed glycoprotein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.33, n.2, p.196-199, March./April., 1985.
- 120.SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L.; ALMEIDA, L.D. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.5, p.1306-1308, September/October, 1979.
- 121.SGARBIERI, V.C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família *Leguminosae*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.32, p.78-84, 1980.
- 122.SGARBIERI, V.C.; CLARKE, E.M.W.; PUSZTAI, A. Proteolytic breakdown of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) storage proteins: nutritional implicatons. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33, n.9, p.881-891, September, 1982.

- 123.SGARBIERI, V.C.; WHITAKER, J.R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, Orlando, v.28, p.93-166, 1982.
- 124.SHEKIB, L.A.E.; ZOUIL, M.E.; YOUSSEF, M.M.; MOHAMMED, M.S. Effect of cooking on the chemical composition of lentils, rice and their blends (kohary). **Food Chemistry**, Essex, v.18, n.3, p.163-168, 1985.
- 125.SIRCAR, B.; JOHNSON, L.R.; LICHTENBERGER, L.M. Effect of synthetic diets on gastrointestinal mucosa DNA synthesis in rats. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.244, n.3, p.G327-G335, March, 1983.
- 126.SKILTON, G.A.; MOUGHAN, P.J.; SMITH, W. Determination of endogenous amino acid flow at the terminal ileum of the rat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.44, n.3, p.227-235, 1988.
- 127.SOUTHON, S.; LIVESEY, G.; GEE, J.M.; JOHNSON, J.T. Differences in intestinal protein synthesis and cellular proliferation in well-nourished rats consuming conventional laboratory diets. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.53, n.1, p.87-95, July., 1985.
- 128.TASMAN-JONES, C.; OWEN, R.L.; JONES, A.L. Semipurified dietary fiber and small-bowel morphology in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.27, n.6, p.519-524, June, 1982.
- 129.THOMPSON, L.U.; GABON, J.E. Effect of lectins on salivary and pancreatic amylase activities and the rate of starch digestion. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.4, p.1050-1053, 1058, July/August., 1987.
- 130.THOMPSON, L.U.; YOON, J.H. Starch Digestibility as affected by polyphenols phytic acid. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, n.4, p.1228-1229, July/August, 1984.
- 131.TOPPING, D.L.; ILLMAN, R.J. Bacterial fermentation in the human large bowel: time to change from the roughage model of dietary fibre. **Medical Journal of Australia**, Glebe, v.144, n.6, p.307-309, March, 1986.

132. TWONBLY, J.; MEYER, J.H. Endogenous nitrogen secretions into the digestive track. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.74, n.4, p.453-460, August, 1961.
133. VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 1223p.
134. YOUNOSZAI, M.K.; ADEDOYIN, M.; RANSHAW, J. Dietary Components and gastrointestinal growth in rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.108, n.3, p.341-350, March, 1978.
135. WALKER, A.F. Physiological effects of legumes in the human diet: a review. **Journal of Plant Food**, London, v.4, n.1, p.05-13, 1982.
136. WASSIMI, N.; ABU-SHAKRA, S.; TANNOUS, R.; HALLAB, A. Effect of mineral nutrition on cooking quality lentils. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.58, p.165-172, 1977.
137. WILLIAMS, P.C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, n.3, p.343-348, March, 1973.
138. ZEBROWSKA, T. The course of digestion of different food proteins in the rat. Fractionation of the nitrogen in intestinal contents. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.22, n.2, p.483-491, 1968.