

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA DA NUTRIÇÃO**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE FLATULÊNCIA EM
FEIJÃO-COMUM (*Phaseolus vulgaris*, L.) POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: EFEITO DA MACERAÇÃO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Keila da Silva Queiroz, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de novembro de 2000.

KEILA DA SILVA QUEIROZ
Nutricionista

Campinas, 13 de novembro de 2000


Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Presidente da Banca

PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Orientador

**CAMPINAS – SP
2000**



UNIDADE BO
 N.º CHAMADA:
1232 d
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 43407
 PROC. 16-392101
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 09/02/01
 N.º CPD

CM-00154286-7

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

Q32d

Queiroz, Keila da Silva

Determinação dos fatores de flatulência em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) por cromatografia líquida de alta eficiência: efeito da maceração / Keila da Silva Queiroz. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Feijão comum. 2.Rafinose. 3.Cromatografia líquida de alta eficiência. 4.Dietas. 5.Ratos. I.Oliveira, Admar Costa de. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

KEILA DA SILVA QUEIROZ

Nutricionista

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE FLATULÊNCIA EM
FEIJÃO-COMUM (*Phaseolus vulgaris*, L.) POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: EFEITO DA
MACERAÇÃO**

**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**

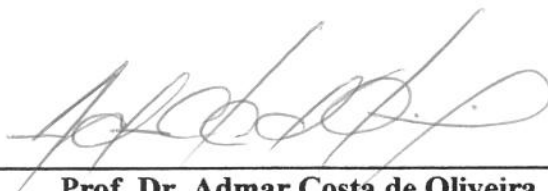
PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA

Orientador

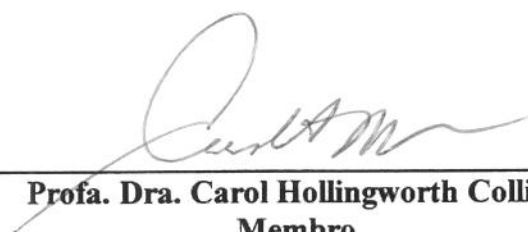
CAMPINAS – SP

2000

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador



Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins
Membro



Prof. Dr. Jayme Amaya-Farfán
Membro

Pro. Dr. Miguel Arcanjo Áreas
Membro

***"Tudo tem seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu:
há tempo de nascer, e tempo de morrer;
tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;
tempo de matar, e tempo de curar;
tempo de derrubar, e tempo de edificar;
tempo de chorar, e tempo de rir;
tempo de prantear, e tempo de dançar;
tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;
tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;
tempo de buscar, e tempo de perder;
tempo de guardar, e tempo de deitar fora;
tempo de rasgar, e tempo de coser;
tempo de estar calado, e tempo de falar;
tempo de amar; e tempo de odiar;
tempo de guerra, e tempo de paz"***

(Eclesiastes 3:1-8)

*À minha família, pelo amor
e apoio, e ao meu querido Léo,
pelo companheirismo e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

À minha querida família, meu porto seguro, pelo estímulo e confiança constantes.

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação e crédito na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo N°9804323-7) pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra. Priscila F. de Medina, do Instituto Agronômico, Campinas, SP, pelo fornecimento do cultivar puro de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) IAC-Carioca.

Ao Dr. Olavo Rusig de M. Cassab Indústria e Comércio Ltda., pelo fornecimento da mistura vitamínica.

À todos os amigos e colegas do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, em especial à Soely e ao Francisco, pelo apoio, amizade e competente colaboração nas análises.

Aos membros da banca examinadora, que contribuíram para o aprimoramento do trabalho através das correções e importantes sugestões.

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

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL	xv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxiii
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxxi
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	04
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÕES	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxiii
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxx
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1 O Feijão-Comum na Alimentação Humana	04
2.2 O Uso da Maceração no Preparo Doméstico do Feijão-Comum	05
2.3 Fatores de Flatulência em Feijão-Comum	08
2.4 Determinação de Oligossacarídeos Tipo Rafinose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Material	12
3.1.1 Fontes Protéicas	12
3.1.2 Animais para Experimentação	12
3.2 Métodos	13
3.2.1 Determinações Químicas	13
3.2.1.1 Composição Centesimal	13
3.2.1.1.1 Proteína Bruta	13
3.2.1.1.2 Lipídeos totais	13
3.2.1.1.3 Fibra Bruta	13
3.2.1.1.4 Umidade	13
3.2.1.1.5 Cinzas	14
3.2.1.1.6 Carboidratos	14
3.2.1.1.7 Açúcares Totais, Açúcares Redutores e Açúcares Não-Redutores	14
3.2.1.1.8 Amido – substâncias sacarificáveis totais	15
3.2.2 Determinação Quantitativa dos Oligossacarídeos Tipo Rafinose	15
3.2.3 Ensaio Biológico	17

3.2.3.1 Preparo das Fontes Protéicas	17
3.2.3.2 Dietas Experimentais	17
3.2.4 Tratamento Estatístico	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Caracterização Química dos Tratamentos de Feijão-Comum	20
4.1.1 Composição Centesimal	20
4.1.2 Açúcares Totais, Açúcares Redutores e Açúcares Não-Redutores	20
4.1.3 Amido – substâncias sacarificáveis totais	22
4.2 Oligossacarídeos Rafinose, Estaquiose e Verbascose	24
4.3 Ensaio Biológico	34
5 CONCLUSÕES	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico	18
Tabela 2. Açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores nos diferentes tratamentos de feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.), cultivar IAC-Carioca, e na água de maceração residual, em base seca (média e desvio-padrão, no mínimo n=3) – lote 05/99	21
Tabela 3. Teores de amido em termos de substâncias sacarificáveis totais nos diferentes tratamentos de feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.), cultivar IAC-Carioca, e na água de maceração residual (média e desvio-padrão, no mínimo n=3) – lote 05/99	23
Tabela 4. Oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose nos diferentes tratamentos de feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.), cultivar IAC-Carioca, e na água de maceração residual, em base seca (média e desvio-padrão, no mínimo n=3) – lote 05/99	24
Tabela 5. Tempo de retenção relativo (t_R) em minutos entre os oligossacarídeos (verbascose – rafinose) e (verbascose – estaquiase), encontrados na literatura e aqueles determinados na presente Dissertação	26

Tabela 6. Percentagem de oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose em relação aos teores de açúcares totais nos diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99

33

Tabela 7. Ganho de peso (g), consumo de proteína (g) e Quocientes de Eficiência da Dieta (QED) e de Eficiência Protéica Líquida (NPR) das dietas experimentais (média e desvio-padrão) cujas fontes protéicas eram caseína controle (CC), caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual (CSS), feijão cozido sem maceração (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual (FCCAM), obtidos no ensaio biológico com ratos Wistar machos recém-desmamados, 8 ratos por dieta, durante 10 dias

34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação estrutural dos oligossacarídeos tipo rafinose segundo Meredith *et al.* (1988) 08

Figura 2. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts × tempo em minutos) no feijão-comum cru (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH₂ (12,5 × 4 mm), fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), fluxo 1ml/min, detector índice de refração 27

Figura 3. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts × tempo em minutos) no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99, cozido sem maceração liofilizado. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH₂ (12,5 × 4 mm), fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), fluxo 1ml/min, detector índice de refração 28

Figura 4. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts × tempo em minutos) no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99, cozido sem a água de maceração residual liofilizado. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH₂ (12,5 × 4 mm), fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração 29

Figura 5. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts × tempo em minutos) no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99, cozido com a água de maceração residual liofilizado. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH₂ (12,5 × 4 mm), fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração

30

Figura 6. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts × tempo em minutos) da água de maceração residual. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH₂ (12,5 × 4 mm), fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração

31

Figura 7. Quocientes de Eficiência da Dieta (QED) e de Eficiência Protéica Líquida (NPR), média e desvio-padrão, de ratos Wistar machos recém-desmamados, 8 ratos por dieta, durante 10 dias alimentados com as dietas experimentais caseína controle (CC), caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual (CSS), feijão cozido sem maceração (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual (FCCAM)

36

RESUMO

No preparo doméstico do feijão, geralmente é utilizada a maceração como método prévio à cocção. Esta prática traz modificações na constituição química, como por exemplo, nos fatores de flatulência e no valor nutritivo do feijão. Estudou-se o efeito da maceração e do preparo doméstico, na composição química, nos teores de açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores, de amido e de oligossacarídeos tipo rafinose em diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar "IAC-Carioca", e na água de maceração residual. Os diferentes tratamentos foram: feijão cru (FC), feijão cozido sem maceração e liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual e liofilizado (FCSAM), feijão cozido com a água de maceração residual e liofilizado (FCCAM) e água de maceração residual (AM). Os feijões foram macerados por um período de 16 horas, na proporção 3:1 (água:feijão), em temperatura ambiente, sendo posteriormente cozidos em panela de pressão doméstica por 40 minutos cronometrados após exaustão do ar (jato contínuo de vapor de água), congelados, liofilizados e então triturados até a forma de farinha seca. Através de ensaio biológico com ratos Wistar machos recém-desmamados, obtiveram-se os Quocientes de Eficiência da Dieta (QED) e de Eficiência Protéica Líquida (NPR). Foram feitos cinco tratamentos com dietas experimentais isocalóricas ($350,9 \pm 37,9$ kcal/100g) e isoprotéicas ($12,0 \pm 0,5\%$), cujas fontes protéicas eram, respectivamente: FCSM, FCSAM, FCCAM, dieta controle de caseína (CC), caseína mais sólidos solúveis totais encontrados na água de maceração residual (CSS) e dieta aprotéica (AP), para fins corretivos, que eram oferecidas *ad libitum*. A determinação quantitativa dos oligossacarídeos tipo rafinose, por técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), demonstrou que o preparo doméstico do feijão-comum, onde a água de maceração residual era descartada (FCSAM), proporcionou uma redução significativa nos teores dos oligossacarídeos rafinose (25,0%), estaquiose (24,8%) e verbascose (41,7%). Em relação ao tratamento FC, o tratamento FCSAM promoveu redução nos teores de açúcares totais (80,6%), açúcares redutores (58,2%) e açúcares não-redutores (90,3%) e de amido (26,8%). As dietas cuja fonte protéica era

caseína apresentaram valores para o QED ($0,4 \pm 0,0$) e para o NPR ($4,0 \pm 0,1$) que não diferiram entre si ($p>0,05$), e as dietas cuja fonte protéica era feijão-comum também apresentaram valores para o QED ($0,3 \pm 0,0$) e para o NPR ($2,9 \pm 0,1$) que não diferiram entre si, mas que tiveram menores valores em relação às dietas com caseína. Assim, verificou-se que o preparo doméstico do feijão-comum proporcionou uma redução significativa nos teores dos oligossacarídeos tipo rafinose, dos açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores e do amido, principalmente quando a água de maceração não absorvida pelos grãos era descartada (FCSAM). Entretanto, a redução dos fatores de flatulência através da maceração e do preparo doméstico do feijão-comum não interferiu no seu valor nutritivo.

ABSTRACT

On a domestic scale, beans are usually soaked before cooking. This practice results in changes in the composition of the beans, for example, in the factors responsible for flatulence and in the nutritive value of the beans. The effect of soaking and of domestic preparation on the chemical composition of beans was studied, specifically on the contents of total sugars, reducing and non-reducing sugars, starch and raffinose-type oligosaccharides, using different treatments of the common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.), "IAC-Carioca" cultivar, also analysing the residual soaking water unabsorbed by the beans. The different treatments were: raw bean (FC), freeze-dried bean cooked without pre-soaking (FCSM), freeze-dried bean cooked without the residual soaking water (FCSAM), freeze-dried bean cooked in the residual soaking water (FCCAM) and the residual soaking water (AM). The beans were soaked at room temperature for a period of 16 hours in the proportion of 3:1 (water:beans), and then cooked in a domestic pressure cooker for 40 minutes after the air exhaustion (water steam flux continuous). The beans were then frozen, freeze-dried and ground, to give a dry flour. The diet efficiency quotient (QED) and net protein efficiency ratio (NPR) were studied by a biological assay using weaned male Wistar rats. Five treatments were applied with experimental isocaloric (350.9 ± 37.9 kcal/100g) and isoproteic ($12.0 \pm 0.5\%$) diets, whose protein sources were respectively: FCSM, FCSAM, FCCAM, control casein diet (CC), and casein plus the total soluble solids found in the residual soaking water (CSS) plus a protein-free diet (AP) used to correct the results. All were offered *ad libitum*. The quantitative determination of raffinose-type oligosaccharides by HPLC, showed that domestic preparation of the common bean when the residual soaking water was discarded (FCSAM), resulted in a significant reduction of the contents of the oligosaccharides raffinose (25.0%), stachyose (24.8%) and verbascose (41.7%). As compared to the raw bean (FC), the treatment FCSAM resulted in a reduction of the levels of total sugars (80.6%), reducing sugars (58.2%), non-reducing sugars (90.3%) and starch (26.8%). The diets whose protein source was casein, presented QED values (0.4 ± 0.0) and NPR values (4.0 ± 0.1) which did not differ

significantly ($p>0.05$), whereas the diets with the common bean as protein source presented QED values (0.3 ± 0.0) and NPR values (2.9 ± 0.1) which also did not differ with each other, but were lower than those with casein as protein source. Thus it was shown that the domestic preparation of the common bean resulted in significant reductions in the levels of raffinose type-oligosaccharides, total sugars, reducing and non-reducing sugars and starch, especially when the residual soaking water was discarded (FCSAM). The reduction in flatulence factors, by discarding the residual soaking water prior to cooking, however, did not seem to interfere with the nutritive value the bean.

1 INTRODUÇÃO

O feijão é um alimento básico para o brasileiro, chegando quase a representar um dos principais alimentos obrigatórios na dieta das populações rural e urbana. O cultivo desta leguminosa é bastante difundido em todo o território nacional, cuja produção no ano de 1995 foi estimada em 2.946.267 toneladas (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 1996). Considerando todos os gêneros e espécies de feijão englobados nas estatísticas, o Brasil é o segundo maior produtor de feijão do mundo, perdendo apenas para a Índia. Analisando-se somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor mundial, seguido pelo México, tendo um consumo per capita de feijão em torno de 15,8 kg/hab/ano.

As leguminosas são consideradas expressivas fontes de nutrientes na dieta, principalmente para os países em desenvolvimento, tanto em termos de alimento energético como protéico, bem como fonte de oligonutrientes importantes. As leguminosas se destacam por constituírem boa fonte de proteínas, vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina e vitamina B₆) e certos minerais (cálcio, ferro, cobre, zinco, fósforo, potássio e magnésio). Também são excelentes fontes de carboidratos complexos como o amido e fibra alimentar solúvel, esta muito efetiva na diminuição dos níveis séricos de colesterol, e fibra insolúvel que promove a formação do bolo fecal, aumentando o peristaltismo e diminuindo o tempo de trânsito intestinal, e ainda de ácidos graxos polinsaturados livres (linoléico e linolênico).

Contudo, algumas leguminosas possuem atributos indesejáveis, como o longo tempo de cocção e a presença de substâncias causadoras de flatulência. A presença destas e de alguns fatores antinutricionais, como fitatos e taninos, embora tradicionalmente vistos como prejudiciais, podem ter um lado benéfico à saúde, pois o problema pode ser o excesso deles na alimentação (Valenzuela & Sgarbieri, 1990; Knudsen, 1986).

Os oligossacarídeos tipo rafinose (rafinose, estaquiose e verbascose) são α -galactosídeos considerados causadores de flatulência, e sua redução pode ser proporcionada pelo preparo doméstico. No preparo doméstico do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), a maceração, que consiste em deixar os grãos crus em água por 12 a 16 horas, geralmente durante a noite, é prática corrente, e apesar deste procedimento ser secular, seu embasamento não é de caráter científico, sendo portanto empírico. Embora certos fatos sejam conhecidos, como a redução do tempo de cozimento do feijão com a embebição dos grãos, aspectos mais profundos, como a ativação da enzima α -galactosidase (E.C.3.2.1.22) endógena, levando, pelo menos em parte, à clivagem das ligações α -galactosídicas dos oligossacarídeos tipo rafinose, presentes no feijão e causadores de flatulência (Baldini *et al.*, 1985), ou a atividade desta enzima devido à microflora do intestino grosso (Jacorzynsky, 1987), faz com que os oligossacarídeos tipo rafinose presentes em leguminosas continuem objeto de estudo.

Se com relação à utilização ou não da maceração do feijão, embora várias investigações científicas sugiram sua utilização, a questão é ainda controversa, mais controversa é a questão do descarte ou não da água de maceração do feijão não absorvida pelos grãos, ou seja, a água residual, antes do cozimento. Assim, o presente estudo procurou verificar o efeito da maceração, realizada com uma relação 3:1 de água para feijão por 16 horas à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, e do preparo doméstico nos teores de oligossacarídeos causadores de flatulência quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), na composição química, nos teores de açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores e de amido presentes no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca, e na água de maceração residual, e determinar o valor nutritivo dos diferentes tratamentos de feijão mediante ensaios com ratos Wistar machos recém-desmamados, alimentados com dietas experimentais cujas fontes protéicas eram caseína controle (CC), caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual (CSS), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual (FCCAM). Os valores de ganho de peso, consumo de dieta, Quociente

de Eficiência da Dieta (QED) e Quociente de Eficiência Protéica Líquida (NPR) foram avaliados.

Muita importância tem sido dada ao desenvolvimento de cultivares mais resistentes às pragas e às doenças, além de apresentarem melhor valor nutricional. Neste aspecto, o cultivar IAC-Carioca tem sido objeto de muito estudo. A qualidade tecnológica deste cultivar está determinada basicamente pelo seu alto valor protéico e pelo seu comportamento frente ao cozimento, etapa comum a todos processos de industrialização ou para o consumo doméstico; dentre as características relacionadas com o cozimento, a capacidade de absorção de água é uma das mais importantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Feijão-Comum na Alimentação Humana

O feijão-comum é um membro da família *leguminosae*, tribo *Phaseolae*, subfamília *Papilinoideae*. As sementes podem ter formatos arredondados ou elípticos. É um produto agrícola de alta expressão econômica e social constituindo alimento básico de várias populações, sendo a principal fonte de suprimento protéico das classes de menor renda. Cultivado em todo território nacional, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão-comum e um dos maiores consumidores dessa leguminosa. O feijão-comum contribui apreciavelmente na complementação do valor nutricional de dietas à base de cereais. São excelentes fontes de proteínas (18-40%) e de carboidratos (38-60%), constituindo também fonte de tiamina, niacina, cálcio e ferro (Jood *et al.*, 1985). Como fonte energética, os carboidratos estão representados na sua maioria em teores de amido e de fibras, sendo que os oligossacarídeos estão presentes em pequenas mas significativas quantidades. Entre os fatores que limitam a utilização deste alimento estão os oligossacarídeos tipo rafinose causadores de flatulência. Como fonte energética, os carboidratos representam 50-75% dos grãos, sendo que cerca de 38-45% é amido, 3-5% é sacarose, na forma de carboidratos digestíveis totais, e como carboidratos indigestíveis, as fibras brutas representam 3,5-7,0%. Os oligossacarídeos tipo rafinose representam 0,2-0,6%, 1,2-3,5% e 0,2-4,0% para rafinose, estaquiose e verbascose, respectivamente (Sgarbieri, 1989).

Em relação ao perfil aminoacídico, os feijões possuem um alto teor de lisina, mas são deficientes no aminoácido sulfurado metionina, além de, por outro lado, apresentarem baixa digestibilidade. Além deste déficit aminoacídico, os feijões possuem outros fatores indesejáveis, como os oligossacarídeos causadores de flatulência, taninos, fitatos, inibidores enzimáticos e hemaglutininas (Rodríguez-Bürger *et al.*, 1998). Contudo, recentemente, investigações científicas estão verificando possíveis contribuições benéficas de certos

nutrientes tradicionalmente vistos como antinutricionais, como as isoflavonas e os flavonóides (Park *et al.*, 1997).

As quantidades de energia e proteína necessárias para que um indivíduo ou animal consiga manter bom estado nutricional dependem da velocidade com o qual ele está crescendo. Os métodos de avaliação da qualidade protéica compreendem determinações do valor nutritivo através de métodos biológicos e químicos. O Quociente de Eficiência Protéica Líquida (NPR) verifica as variações de peso corporal considerando o peso que o animal teria perdido se não tivesse ingerido a proteína, ou seja, calcula-se a deficiência da proteína ingerida em “manter” e “aumentar” o peso corporal (Angelis, 1995). A nutrição experimental, entre outros aspectos, torna possível averiguar a qualidade do alimento em estudo e extrapolar os resultados para humanos. O emprego do rato de laboratório em pesquisas na área de Nutrição, desde o início deste século, tem propiciado importantes achados e contribuído de maneira singular para formação de bases científicas e de suas aplicações, neste campo de conhecimento.

2.2 O Uso da Maceração no Preparo Doméstico do Feijão-Comum

O preparo doméstico do feijão é uma prática secular e cultural. A cocção é provavelmente o método mais antigo de preparo, e seu objetivo primário é torná-lo adequado ao consumo e desenvolver seu aroma, além de promover inativação, destruição ou remoção de fatores antinutricionais e/ou termolábeis. Entretanto, a literatura sugere que a combinação de dois ou mais métodos podem ser necessários para que a remoção destes fatores seja mais eficiente. A maceração, que consiste em deixar os grãos crus em água por um período de 12 a 16 horas, pode ser um método complementar no preparo de feijões. A água de maceração residual pode ou não ser descartada dependendo das preferências culturais ou pessoais. O descarte da água de maceração residual pode auxiliar na

remoção de componentes hidrossolúveis como os oligossacarídeos tipo rafinose causadores de flatulência. As quantidades de oligossacarídeos tipo rafinose removidos dependem, entretanto, do tempo, da solução e da temperatura de maceração, bem como do tipo de feijão. Os meios de maceração incluem, frequentemente, soluções aquosas, salinas e soluções alcalinas diluídas em meio aquoso. Soluções salinas e alcalinas podem promover remoção de nutrientes solúveis como proteínas e vitaminas. Quando a água de maceração residual e a água de cocção não são descartadas, os teores de oligossacarídeos tipo rafinose podem permanecer após o tratamento térmico. Entretanto, se a água de maceração residual e a água de cocção forem descartadas, quantidades significativas dos oligossacarídeos tipo rafinose podem ser removidas do feijão (Sathe *et al.*, 1984).

Estudos realizados por Castellanos *et al.* (1997), observando os hábitos preferenciais dos consumidores de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) no México, verificaram que somente 29% das famílias usavam a maceração prévia à cocção do feijão, e que cerca de 37% das famílias não usavam a maceração para não afetar negativamente no sabor e na aparência do feijão cozido. Neste estudo, foi realizada análise sensorial para averiguar a aceitação dos feijões cozidos macerados e não macerados, verificando-se que os feijões cozidos não macerados tiveram maior aceitabilidade que os feijões cozidos macerados. Bressani *et al.* (1988) encontraram que menos de 7% das famílias da Guatemala usavam a maceração prévia à cocção. Trugo *et al.* (1990) e Pennacchiotti (1989) demonstraram que a cocção de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) teve efeito pouco significativo na redução de sacarose, rafinose e estaquiose. Jood *et al.* (1986), estudando o efeito de vários tratamentos (maceração, maceração e cocção) em feijões, como *Phaseolus mungo*, demonstraram que os conteúdos de açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores eram diminuídos.

A fim de se determinar o tempo de cocção de feijões, estudos publicados na América Latina sugeriram a maceração prévia à cocção, o que reduziria o tempo de cocção (Bressani *et al.*, 1988). Os aspectos culinários que estabelecem as preferências são o tempo de cocção, o sabor e a aparência do feijão cozido. Com relação às características observadas

pelos consumidores de feijão, estudo realizado por Ferreira & Yokoyama (1999) verificaram que, dentro das preferências culinárias do feijão consideradas mais importantes após o cozimento, os consumidores elegeram o sabor (51%), vindo a seguir o caldo (24%), e em terceiro, o tempo de cozimento (19%).

Ao estudarem as alterações na composição de carboidratos em leguminosas, dentre os quais o feijão-comum, após a maceração e cozimento, Vidal-Valverde *et al.* (1993) verificaram uma redução considerável de monossacarídeos e oligossacarídeos tipo rafinose, especialmente quando a água de maceração residual e de cozimento eram drenadas. Alguns estudos demonstraram que houve uma importante diminuição em oligossacarídeos tipo rafinose e fatores antinutricionais em feijão cozido ou feijão macerado e cozido (Barampama & Simard, 1995 e 1994). Abdel-Gawad (1993) identificou e determinou quantitativamente os oligossacarídeos no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) usando cromatografia gás-líquida (GLC), indicando que 51% dos açúcares totais são os oligossacarídeos tipo rafinose e que após a maceração por 12 horas diminuíram os teores destes oligossacarídeos. Kataria & Chauhan (1988), demonstraram que a maceração do feijão-guandú (*Vigna radiata*, L.) diminuía o teor de açúcares totais, açúcares redutores, açúcares não-redutores e amido.

Vários métodos de preparo de leguminosas, especialmente aqueles que envolvem tratamento térmico, são imprescindíveis para a nutrição humana, pois aumentam a utilização protéica e a disponibilidade de carboidratos presentes nos grãos. Com a hidratação dos grãos durante a maceração e após a cocção ocorrem degradações, desnaturações de fatores antinutricionais e formação de complexos insolúveis promovendo uma redução dos fatores antinutricionais em feijões (Chau & Cheung, 1997). Durante a cocção de feijões, o amido é gelatinizado e sua disponibilidade é aumentada, porém existem frações no amido que são resistentes à ação enzimática, passando livres do intestino delgado para o intestino grosso, onde são fermentados pela microflora colônica (Bravo *et al.*, 1998).

2.3 Fatores de Flatulência em Feijão-Comum

Algumas leguminosas têm deficiência em certos nutrientes e possuem fatores antinutricionais ou de flatulência. A existência destes fatores podem interferir na utilização deste tipo de alimento. O feijão-comum apresenta em sua composição quantidades apreciáveis de oligossacarídeos tipo rafinose, como a rafinose, a estaquiose e a verbascose, responsáveis pela flatulência – retenção de gases no intestino – em humanos. Muitas investigações evidenciam que, após ingestão de feijão, os oligossacarídeos tipo rafinose, além de causarem flatulência, também causam sensação de desconforto abdominal e diarreia (Ida *et al.*, 1981; Reddy *et al.*, 1984). Nestes oligossacarídeos, a sacarose é a unidade básica e contém um ou mais grupos de α -galactopiranosil em sua estrutura, sendo que as unidades de α -galactosil estão ligadas sempre do lado esquerdo da sacarose, mais particularmente, na molécula de glicose, como descrito por Meredith *et al.* (1988) (Figura 1).

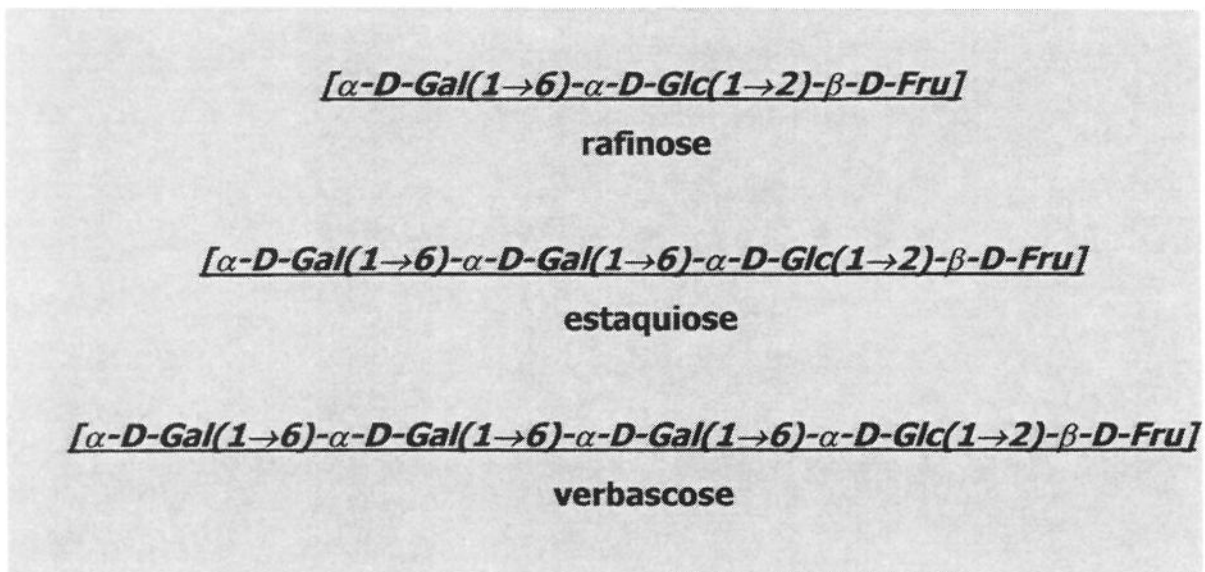


Figura 1. Relação estrutural dos oligossacarídeos tipo rafinose segundo Meredith *et al.* (1988)

A causa da flatulência é aparentemente a falta de atividade da enzima α -galactosidase (E.C.3.2.1.22) no trato digestivo de humanos e de animais experimentais, pois os oligossacarídeos tipo rafinose não são hidrolisados nem absorvidos no intestino delgado e ao passarem pelo intestino grosso são anaerobicamente fermentados, produzindo gases como o H_2 , CO_2 e CH_4 , causando flatulência, diarreia e dor abdominal (Sánchez-Mata *et al.*, 1998; Price *et al.*, 1988). Alguns polissacarídeos, como as fibras insolúveis e o amido resistente, também podem favorecer a fermentação no lúmen intestinal, contribuindo para o processo de flatulência em humanos.

Por outro lado, os oligossacarídeos tipo rafinose podem ser considerados fatores bifidogênicos, ou seja, são carboidratos fermentados pelas *Bifidus bacterium spp* presentes principalmente no intestino grosso de mamíferos produzindo substâncias que podem ser benéficas à saúde humana, como síntese de vitaminas do complexo B (B_1 , B_2 , B_6 e B_{12}), ácido fólico, ácido nicotínico e de ácidos graxos de cadeia curta, que conferem maior proteção aos colonócitos (Playne & Crittenden, 1996). As bifidobactérias são estritamente anaeróbicas e estão presentes principalmente na microflora intestinal de crianças alimentadas com leite materno, e sua colonização diminui com a idade do indivíduo (O'Sullivan, 1996).

Estudos realizados com oligossacarídeos tipo rafinose em soja demonstraram que as bifidobactérias possuem funções protetoras, tais como garantir a imunidade, e funções reguladoras ou preventivas, pois evitam constipação pelo aumento do peristaltismo e da pressão osmótica intestinais, diminuem os níveis de hipercolesterolemia, regulam a pressão arterial, aumentam a absorção de cálcio, possuem ação anticancerígena e impedem a produção de produtos tóxicos da fermentação bacteriana (Mizota, 1996; Yashima, 1996). Em alguns países, organizações estipularam recomendações diárias de oligossacarídeos como método preventivo de doenças e manutenção da saúde. Entretanto, este aspecto carece de estudo, pois investigações sobre o efeito da maceração na remoção ou redução dos teores de oligossacarídeos tipo rafinose, que poderiam ser considerados bifidogênicos, em feijão-comum, são escassas na literatura científica.

2.4 Determinação de Oligossacarídeos Tipo Rafinose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A determinação de açúcares geralmente é feita utilizando-se métodos volumétricos ou enzimáticos, mas eles são desvantajosos pois não determinam os açúcares presentes na amostra de forma individual e simultânea. Os métodos cromatográficos têm demonstrado maior eficácia na determinação de açúcares. A determinação quantitativa de mono- e de oligossacarídeos, incluindo aqueles causadores de flatulência, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido estudada por alguns autores (Johansen *et al.*, 1996; Meredith *et al.*, 1988; Reeta & Verma, 1981). Na HPLC utiliza-se instrumentos sofisticados e automatizados, tais como reservatório de fase móvel, medidor e controlador de pressão, válvulas para amostragem, detectores por absorbância no ultravioleta, por fluorescência e por índice de refração e registro de dados através de microprocessador, empregando pequenas colunas e uma fase móvel eluída sob altas pressões. É um método vantajoso pois proporciona um menor tempo para análise, alta resolução, resultados quantitativos, boa sensibilidade, versatilidade e automatização (Carvalho, 1993).

Na determinação de oligossacarídeos tipo rafinose, vários autores demonstraram que as seguintes condições cromatográficas proporcionaram melhores resultados: coluna revestida com grupos amino, acetonitrila-água (75:25 v/v) como fase móvel e detecção por índice de refração (Hernández *et al.*, 1998). Revilleza *et al.* (1990), utilizando HPLC, verificaram que os níveis de rafinose, estaquiose e verbascose aumentaram após maceração nos feijões hiacinti (*Dolichos lablab*). Entretanto, outros autores observaram redução dos teores de oligossacarídeos tipo rafinose em feijões, quantificados por HPLC, após maceração com ou sem descarte da água de maceração residual submetidos ao cozimento (Vidal-Valverde *et al.*, 1998; Nwinuka *et al.*, 1997; Vijayakumari *et al.*, 1996; Khalil & Mansour, 1995).

Diante da importância na produção e consumo no país, além de seu valor nutricional e cultural do feijão-comum, torna-se interesse de estudo o efeito da maceração e do preparo doméstico nos teores de oligossacarídeos tipo rafinose na utilização deste alimento, visto que na literatura as controvérsias não esclarecem ou não definem uma tendência para esta prática culinária.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Fontes Protéicas

Utilizou-se feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivar IAC-Carioca, de importância econômica e disponível na coleção do Instituto Agronômico, Campinas, SP, lote 05/1999. A matéria-prima era submetida a diferentes tratamentos; dois tratamentos de feijão (proporção feijão:água de 1:3) eram submetidos a maceração por 16 horas à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, cozidos em panela de pressão doméstica por 40 minutos cronometrados após exaustão do ar (jato contínuo de vapor de água). Um destes tratamentos era cozido com a água de maceração residual e o outro sem a água de maceração residual, ao qual foi acrescentado água para o cozimento. Foi feito um terceiro tratamento onde o feijão era cozido sem maceração, nas mesmas condições de cozimento. Os feijões cozidos foram congelados em freezer doméstico e depois liofilizados (liofilizador Virtis, modelo 10-146 MR-BA), sendo então triturados, obtendo-se os mesmos em forma de farinha com granulometria 70 mesh. Como controle foi utilizado caseína comercial com teor protéico 80,2%, proveniente de M. Cassab Comércio e Indústria Ltda.

3.1.2 Animais para experimentação

Utilizou-se 48 ratos albinos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados (21 dias), com peso inicial $53,4 \pm 5,4$ g, provenientes do CEMIB - Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, SP. Foram utilizados 8 ratos por dieta (tratamento) em gaiolas de crescimento individuais, com dieta e água fornecidas *ad libitum*, no Laboratório de Ensaios Biológicos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da UNICAMP, Campinas, SP, com temperatura e umidade relativa de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e 50-60%, respectivamente, e ciclos 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 nos feijões cru e cozido sem maceração liofilizado pelo método semimicro Kjeldahl (AOAC, 1975), utilizando-se como catalisador na fase da digestão o dióxido de titânio (Williams, 1973) e utilizando-se 5,40 como fator de conversão de nitrogênio para proteína nos feijões (Mossé, 1990). O conteúdo de proteína bruta na caseína utilizada nas dietas experimentais foi calculado utilizando-se 6,38 como fator de conversão para proteína de caseína (AOAC, 1995).

3.2.1.1.2 Lipídeos Totais

Foram determinados segundo método de Bligh & Dyer (1959), usando os solventes clorofórmio, metanol e água.

3.2.1.1.3 Fibra Bruta

Foi determinado segundo método de Scharrer e Kürschner, descrito por Angelucci *et al.* (1987), usando ácido nítrico, ácido tricloroacético e ácido acético para hidrólise.

3.2.1.1.4 Umidade

A determinação da umidade foi realizada por gravimetria, utilizando estufa a 105°C até peso 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

Determinados por diferença, usando a fórmula: $100 - (\text{proteína bruta} + \text{lipídeos totais} + \text{fibra bruta} + \text{cinzas})$.

3.2.1.1.7 Açúcares Totais, Açúcares Redutores e Açúcares Não-Redutores

A determinação de açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores seguiu a metodologia proposta por Lara (1976), com modificações para as condições de trabalho. Os açúcares foram extraídos de 1 grama de farinha de feijão cru (FC), feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM), feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado (FCSAM), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), e 10 ml de água de maceração residual (AM). As amostras foram levadas a volume com água destilada para se obter 200 ml de solução. Determinou-se os açúcares redutores em uma alíquota de 10 ml desta solução. Para determinar os açúcares totais, transferiu-se 50 ml da solução anterior para um balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 2 ml de ácido clorídrico concentrado, aqueceu-se em banho-maria a 70°C por 2 minutos. Após resfriar o balão, neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio a 40%, utilizando-se papel indicador. Completou-se o volume com água destilada e determinou-se os açúcares totais em uma alíquota de 10 ml desta solução. Os açúcares não-redutores foram calculados por diferença. A técnica de titulação seguiu o método Eynon e Lane (AOAC, 1970), utilizando Aparelho de Oxirredutimetria por Titulação Redutec, modelo TE 086 da Tecnal. Todas as análises foram feitas no mínimo em triplicata.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3.2.1.1.8 Amido - substâncias sacarificáveis totais

A determinação de amido, em termos de substâncias sacarificáveis totais, seguiu o método clássico de Bergeret (1937), com modificações para as condições de trabalho, para produtos amiláceos. Utilizou-se como amostra 10 gramas de farinha de feijão cru (FC), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado (FCSAM), feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM), e 10 ml de água de maceração residual (AM). As amostras foram transferidas para balão volumétrico de fundo chato de 250 ml. Adicionou-se 75 ml de água destilada e 15 ml de ácido clorídrico concentrado. Procedeu-se destilação por 2 horas. Após resfriar o balão, filtrou-se com lã de vidro e neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio 2 mol/L, utilizando-se papel indicador. As amostras foram levadas a volume com água destilada para se obter 200 ml de solução. Determinou-se as substâncias sacarificáveis totais por titulação segundo o método de Eynon e Lane (AOAC, 1970), com modificações, utilizando-se Aparelho de Oxirredutimetria por Titulação, modelo TE 086 da Tecnal. Determinou-se os teores de amido multiplicando-se o resultado encontrado pelo fator 0,90. Todas as análises foram feitas no mínimo em triplicata.

3.2.2 Determinação Quantitativa dos Oligossacarídeos Tipo Rafinose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a extração e determinação quantitativa dos oligossacarídeos tipo rafinose, foi utilizada a metodologia proposta por Vidal-Valverde *et al.* (1993). Para tanto, os oligossacarídeos tipo rafinose foram extraídos de 10 gramas de farinha de feijão cru (FC), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de residual liofilizado (FCSAM), feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM), e 10 ml de água de maceração residual (AM) com 100 ml de solução de etanol a 80%, utilizando-se destilação por 15 minutos, seguido de filtração em funil de vidro Hermex com placa porosa nº1. O resíduo foi reextraído duas vezes e lavado com água

destilada até que o Teste da Reação de Molisch (Assumpção & Morita, 1968) fosse negativo. Completou-se o volume a 100 ml, evaporou-se a solução de etanol a 80% em rotavapor (modelo RE Büchi) a 50°C e usou-se alíquotas deste extrato, filtrado em membrana Millipore (ME 0,45 μm $\times$ 47 mm) para análise cromatográfica.

As determinações foram realizadas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, provido de bomba (Varian 9012), utilizando o programa de bomba Star Chromatography Workstation e detector de índice de refração (Varian Star 9040 IR). Utilizou-se as seguintes condições cromatográficas:

- Coluna: NH_2 (12,5 $\times$ 4 mm);
- Fase móvel: acetonitrila-água ultra pura (18,2 M Ω), 75:25 v/v;
- Velocidade de fluxo: 1 ml/min;
- Volume de injeção: 20 μl ;
- Detector de índice de refração (Carvalho, 1993).

Padrões de rafinose (O- α -D-galactopyranosyl-[1 $\rightarrow$ 6]- α -D-glucopyranosyl- β -D-frutofuranoside) e de estaquiose (α -D-galactopyranosyl-[1 $\rightarrow$ 6]- α -D-galactopyranosyl-[1 $\rightarrow$ 6]- α -D-glucopyranosyl- β -D-frutofuranoside) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) foram utilizados para estudar a linearidade da concentração dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose em relação às áreas dos picos e construção da curva de calibração. Injeções de soluções de 0,25, 0,50 e 1,00 mg/ml de rafinose + estaquiose em água ultra pura, foram estudadas.

A quantificação de cada oligossacarídeo foi feita por comparação da altura dos picos com os correspondentes padrões, no mínimo em triplicata, à exceção do oligossacarídeo verbascose, cujo padrão não foi disponível, sendo então identificado pelo tempo de retenção (Frias *et al.*, 1994; Revilleza *et al.*, 1990; Sosulki *et al.*, 1982; Macrae & Zand-Moghaddam, 1978) e quantificados comparando-se com as áreas dos picos cromatográficos dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose (Frias *et al.*, 1994).

3.2.3 Ensaio Biológico

3.2.3.1 Preparo das Fontes Protéicas

A matéria-prima era submetida a diferentes tratamentos; dois tratamentos de feijão (proporção feijão:água de 1:3) eram submetidos à maceração por 16 horas à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, cozidos em panela de pressão doméstica por 40 minutos cronometrados após a exaustão do ar (jato contínuo de vapor de água). Um destes tratamentos era cozido com a água de maceração residual e o outro sem a água de maceração residual, ao qual foi acrescentado água para o cozimento. Foi feito um terceiro tratamento onde o feijão era cozido sem maceração, nas mesmas condições de cozimento. Os feijões cozidos foram congelados em freezer doméstico e depois liofilizados (liofilizador Virtis, modelo 10-146 MR-BA), sendo então triturados obtendo-se em forma de farinha com granulometria 70 mesh.

3.2.3.2 Dietas Experimentais

Foram feitas formulações das dietas experimentais, para realização do ensaio biológico. O ensaio biológico teve 5 tratamentos: A. dieta cuja única fonte protéica era caseína (CC); B. dieta cuja fonte protéica era caseína mais o teor de sólidos solúveis encontrado na água de maceração residual (CSS), para fins comparativos; C. dieta cuja fonte protéica era feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM) e sob forma de farinha com granulometria 70 mesh; D. dieta cuja fonte protéica era feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado (FCSAM) e também sob forma de farinha com mesma granulometria; E. dieta cuja fonte protéica era feijão cozido sem maceração (FCSM), nas mesmas condições; e uma dieta aprotéica (AP) isocalórica, que era utilizada para fins corretivos.

As 5 dietas experimentais eram isoprotéicas ($12,0 \pm 0,5\%$) e isocalóricas ($350,9 \pm 37,9$ kcal/100g). As dietas foram formuladas segundo o "American Institute of Nutrition" (Reeves *et al.*, 1993), dieta AIN-93G, para ratos em crescimento, à exceção do teor protéico, para determinação do índice de qualidade protéica (Pellet & Young, 1980). As formulações das dietas, bem como as misturas salina e vitamínica utilizadas nas dietas, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico

Ingredientes	Dieta ¹		
	Caseína*	Feijão**	Aprotéica
Feijão	-	617	-
Amido de milho	453	-	603
Caseína	150	-	-
Amido dextrinizado	132	167	132
Sacarose	100	86	100
Óleo de soja	70	70	70
Fibra (celulose)	50	15	50
Mistura Vitamínica²	10	10	10
Mistura Mineral³	35	35	35

¹ Valores em g/kg de dieta. Em todas as dietas foram adicionadas L-cistina (3,00 g/kg), bitartarato de colina (2,50 g/kg) e tetrabutylhidroquinona (0,01 g/kg), segundo formulação da AIN 93-G.

*Dieta controle de caseína e dieta de caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual liofilizada

**Dieta de feijão cozido sem maceração liofilizado, dieta de feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado, dieta de feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado

² ácido nicotínico (30 mg/kg), pantotenato (15 mg/kg), piridoxina (6 mg/kg), tiamina (5 mg/kg), riboflavina (6 mg/kg), ácido fólico (2 mg/kg), vitamina K (750 µg/kg), D-biotina (200 µg/kg), vitamina B₁₂ (25 µg/kg), vitamina A 4000 UI/kg, vitamina E 75 UI/kg.

³ (g/kg de mistura mineral): carbonato de cálcio (357,00), fosfato de potássio (196,00), citrato de potássio tribásico (70,78), cloreto de sódio (74,00), sulfato de potássio (46,60), óxido de magnésio (24,00), citrato férrico (6,06), carbonato de zinco (1,65), carbonato de manganês (0,63), carbonato cúprico (0,30), iodeto de potássio (0,01), selenato de sódio (0,01025), paramolibdato de amônio (0,00795), metassilicato de sódio (1,45), sulfato de potássio e cromo (0,275), cloreto de lítio (0,0174), ácido bórico (0,0815), fluoreto de sódio (0,0635), carbonato de níquel (0,0318), vanadato de amônio (0,0066).

3.2.4 Tratamento Estatístico

Os resultados foram submetidos a análise de variância ANOVA e testes de confronto de médias, de Duncan e Dunett, usando o programa Statistica, considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Química dos Tratamentos do Feijão-Comum

4.1.1 Composição Centesimal

Os dados obtidos sobre a composição do feijão-comum foram consistentes, constituindo em uma boa fonte protéico-energética. A composição centesimal, em base seca, encontrada para feijão cru e feijão cozido sem maceração liofilizado era, em percentagem, $18,36 \pm 0,11$ e $19,81 \pm 0,09$, $2,31 \pm 0,03$ e $2,48 \pm 0,05$, $0,62 \pm 0,01$ e $1,33 \pm 0,03$, $4,64 \pm 0,14$ e $5,69 \pm 0,15$, e, 64,70 e 69,22, para os teores de proteína bruta, lipídeos totais, cinzas, fibra bruta, e carboidratos, respectivamente, e umidade de $9,37 \pm 0,02$ e $1,47 \pm 0,12$, o que está em concordância com outros autores (Tezoto & Sgarbieri, 1990; Sgarbieri, 1989).

4.1.2 Açúcares Totais, Açúcares Redutores e Açúcares Não-Redutores

Os teores dos açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores, estão demonstrados na Tabela 2. Verificou-se que o processo da maceração seguido de cocção ocasionou uma redução nos teores dos três tipos de açúcares, e que somente o processo de cocção também ocasionou uma redução, embora de menor magnitude, à exceção dos açúcares redutores. Os teores dos açúcares redutores encontrados estão de acordo com outros autores (Bakr, 1996; Khalil & Mansour, 1995) que estudaram o efeito da maceração e da cocção na redução dos teores de açúcares em leguminosas. No preparo doméstico do feijão-comum, a embebição dos grãos solubiliza os açúcares, tornando-os livres ou degradando-os. Este processo poderia contribuir para a redução dos teores dos açúcares.

Tabela 2. Açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores nos diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca, e na água de maceração residual, em base seca (média e desvio-padrão, no mínimo n=3) – lote 05/99.

Tratamento	Açúcares Totais (%)	Açúcares Redutores (%)	Açúcares Não-Redutores* (%)
Feijão Cru	20,03 ± 0,07 ^a	6,05 ± 0,04 ^a	13,98 ± 0,06 ^a
FCSM*	15,52 ± 0,09 ^b	3,54 ± 0,02 ^b	11,98 ± 0,06 ^b
FCSAM**	3,89 ± 0,03 ^c	2,53 ± 0,05 ^c	1,36 ± 0,04 ^c
FCCAM***	8,85 ± 0,00 ^d	3,05 ± 0,05 ^d	5,80 ± 0,03 ^d
AM****	0,69 ± 0,00 ^e	0,65 ± 0,01 ^e	0,03 ± 0,01 ^e

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

* valores obtidos por diferença

FCSM*- Feijão cozido sem maceração liofilizado

FCSAM**- Feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado

FCCAM***- Feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado

AM****- Água de maceração residual (valores expressos em g/100g de feijão cru, em base seca)

A análise da Tabela 2 mostrou que apenas o processo de cocção (FCSM) foi responsável pela redução de 22,5% dos açúcares totais. Entretanto, ao se considerar o processo de maceração prévia à cocção, onde a água de maceração residual foi descartada (FCSAM), observou-se que a redução atingiu 80,6%, comparando-se o teor dos açúcares totais encontrados no feijão cru com aquele encontrado no feijão cozido sem água de maceração residual liofilizado. Ao se considerar o volume total da água de maceração residual (AM) obtida após drenagem do feijão-comum cru macerado, encontrou-se as respectivas quantidades de açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores removidos do feijão-comum cru (2090,63 g de feijão-comum cru/3600 ml de água residual), em base seca: 14,40 ± 0,00 g, 13,68 ± 0,01 g e 0,72 ± 0,01 g.

As mudanças químicas e físicas que ocorreram no feijão-comum e na água durante a maceração ainda não estão bem entendidas. Segundo Bakr (1996), a hidratação que ocorreu no feijão-comum poderia facilitar a extração de componentes para a água de maceração. Esta hidratação ativaria enzimas do feijão-comum, causando degradação endógena de constituintes, gerando produtos de clivagem que passariam para a água de maceração, difundindo produtos de baixo peso molecular. Neste sentido, alguns açúcares, dentre estes glicose, frutose, sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose, poderiam estar presentes na água de maceração residual. O tratamento térmico também poderia contribuir com as alterações físico-químicas no feijão-comum, tais como mudanças na estrutura resultante do grão, o que poderia ser constatado nas quantidades encontradas dos açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores nos diferentes tratamentos de feijão-comum cozidos macerados ou não macerados em relação ao feijão-comum cru.

4.1.3 Amido - substâncias sacarificáveis totais

Nas leguminosas, o amido é o principal carboidrato do ponto de vista quantitativo. As leguminosas são preparadas e cozidas em diferentes formas, dependendo das preferências culturais. Diferentes tratamentos e preparos podem afetar os níveis de carboidratos disponíveis nas leguminosas. No caso do amido, com o preparo doméstico do feijão-comum, ele é gelatinizado e sua disponibilidade fica aumentada (Casañas *et al.*, 1999).

A existência de frações no amido que são resistentes à ação enzimática – amido resistente, e de alguns polissacarídeos como a fibra insolúvel que são fermentados pela microbiota intestinal, contribuem com o processo de flatulência, juntamente com os oligossacarídeos tipo rafinose (Bravo *et al.*, 1998).

Os teores de amido (substâncias sacarificáveis totais) encontrados para os diferentes tratamentos feijão-comum e na água de maceração estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Teores de amido em termos de substâncias sacarificáveis totais nos diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca, e na água de maceração, em base seca (média e desvio-padrão, no mínimo n=3) – lote 05/99.

Tratamento	Teor de Amido (%)
Feijão Cru	46,76 ± 0,05 ^a
FCSM*	40,19 ± 0,00 ^b
FCSAM**	34,21 ± 0,06 ^c
FCCAM***	36,91 ± 0,07 ^d
AM****	0,46 ± 0,00 ^e

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

FCSM*- Feijão cozido sem maceração liofilizado

FCSAM**- Feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado

FCCAM***- Feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado

AM****- Água de maceração residual (valores expressos em g/100g de feijão cru, em base seca)

Verificou-se que o teor de amido diferiu (p<0,05) entre o tratamento feijão cru e os demais tratamentos de feijão, que apresentaram uma redução nos teores. No tratamento FCSAM, onde a água de maceração residual foi descartada, observou-se redução de 26,8% em relação ao feijão cru. Assim, como observado nas quantidades encontradas dos açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores, a maceração associada ou não à cocção, contribuiu para redução nas quantidades das substâncias sacarificáveis totais nos diferentes tratamentos de feijão-comum cozidos macerados ou não macerados em relação ao feijão cru. Ao se considerar o volume total da água de maceração residual (AM) obtida após drenagem do feijão-comum cru macerado, encontrou-se 9,72 g de amido removidos em feijão-comum cru (2090,63 g de feijão-comum cru/3600 ml de água residual). Os valores encontrados estão em concordância com outros autores (Vidal-Valverde *et al.*, 1998; Nwinuka *et al.*, 1997; Kataria *et al.*, 1990; Sgarbieri, 1989; Jood *et al.*, 1986).

4.2 Oligossacarídeos Rafinose, Estaquiose e Verbascose

Os teores dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose determinados por HPLC estão demonstrados na Tabela 4. Verificou-se que na determinação das curvas de calibração dos padrões oligossacarídeos rafinose e estaquiose, foram encontrados os coeficientes de regressão r^2 0,995502 e 0,995763, respectivamente.

Tabela 4. Oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose nos diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca, e na água de maceração residual, em base seca (média e desvio-padrão, no mínimo n=3) – lote 05/99.

Tratamento	Rafinose (%)	Estaquiose (%)	Verbascose (%)
Feijão cru	0,40 ± 0,03 ^a	3,23 ± 0,18 ^a	0,12 ± 0,01 ^a
FCSM*	0,32 ± 0,04 ^b	2,95 ± 0,15 ^{bd}	0,08 ± 0,00 ^b
FCSAM**	0,30 ± 0,02 ^b	2,43 ± 0,04 ^c	0,07 ± 0,00 ^b
FCCAM***	0,48 ± 0,02 ^c	2,85 ± 0,07 ^d	0,10 ± 0,01 ^{ab}
AM****	0,19 ± 0,03 ^d	0,41 ± 0,02 ^e	0,07 ± 0,02 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

FCSM* - Feijão cozido sem maceração liofilizado

FCSAM** - Feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado

FCCAM*** - Feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado

AM**** - Água de maceração residual (valores expressos em g/100g de feijão cru, em base seca)

Na Tabela 4, comparou-se os teores dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose dos tratamentos feijão cru (FC), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM) e na água de maceração residual (AM), todos em base seca. Observou-se que, em relação ao tratamento FC, houve uma redução nos teores dos oligossacarídeos rafinose (20,0% e 25,0%), estaquiose (8,7% e 24,8%) e verbascose (33,3% e 41,7%) para os tratamentos FCSM e FCSAM,

respectivamente. No tratamento FCCAM, observou-se redução nos teores dos oligossacarídeos estaquiose (11,8%) e verbascose (16,7%) e um aumento dos teores do oligossacarídeo rafinose (20%) em relação ao feijão cru. Observou-se também que o oligossacarídeo verbascose foi o oligossacarídeo encontrado em menor quantidade nos diferentes tratamentos de feijão-comum, o que está de acordo com outros autores (Revilleza *et al.*, 1990). A redução dos oligossacarídeos tipo rafinose após maceração seguida de cocção onde a água de maceração residual era descartada (FCSAM), demonstraram a hidrossolubilidade destes oligossacarídeos. Segundo Sathe *et al.* (1984), os teores dos oligossacarídeos tipo rafinose poderiam ser removidos do feijão se a água de maceração residual for descartada, pois os oligossacarídeos tipo rafinose estão solubilizados e livres, porém se a água de maceração residual não for descartada, os oligossacarídeos tipo rafinose poderiam permanecer, fato este que pôde ser observado no tratamento FCCAM, em relação aos teores do oligossacarídeo rafinose. Os teores dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose encontrados estão de acordo com os resultados obtidos por Vidal-Valverde *et al.* (1998), Nwinuka *et al.* (1997), Khalil & Mansour (1995), Abdel-Gawad (1993) e Sgarbieri (1989), ao verificarem que o preparo doméstico do feijão-comum proporcionou redução significativa ($p < 0,05$) nos teores dos oligossacarídeos tipo rafinose.

Assim, as mudanças que ocorreram nos teores de açúcares, especificamente nos teores de oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose, na maceração e na cocção, associadas ou não, poderiam ser atribuídas à natureza da estrutura resultante dos grãos, ao metabolismo nos grãos, à difusão de componentes para a água de maceração e a influência do crescimento de microrganismos na água de maceração (Frias *et al.*, 1996; Mulywidarso *et al.*, 1991).

Os tempos de retenção médios, em minutos, na determinação por HPLC encontrados para os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose foram, respectivamente: $6,90 \pm 0,11$, $12,93 \pm 0,31$ e $24,03 \pm 0,79$. Alguns fatores influenciam no tempo de retenção das amostras, como grau de afinidade da amostra com a fase móvel e com a fase estacionária, solubilidade da amostra na fase móvel e o tamanho molecular (Collins *et al.*, 1995). O tempo

de retenção engloba todo o tempo que o componente em questão fica no sistema cromatográfico, quer na fase móvel, quer na fase estacionária. Foi calculado o tempo de retenção relativo (t_R) em minutos do oligossacarídeo verbascose nos diferentes tratamentos de feijão-comum e na água de maceração para melhor justificar a localização do pico cromatográfico bem como sua quantificação. Este parâmetro, demonstrado na Tabela 5, foi obtido pela diferença entre o tempo de retenção dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose, separadamente, e o tempo de retenção do oligossacarídeo verbascose (Frias *et al.*, 1994; Revilleza *et al.*, 1990; Sosulki *et al.*, 1982; Macrae & Zand-Moghaddam, 1978).

Tabela 5. Tempo de retenção relativo (t_R) em minutos entre os oligossacarídeos (verbascose - rafinose) e (verbascose - estaquiose), de acordo com os valores encontrados na literatura e aqueles determinados na presente Dissertação.

t_R (min)	verbascose - rafinose	verbascose - estaquiose
Valores da literatura*	16,67 $\pm$ 0,58	11,33 $\pm$ 1,11
Valores encontrados**	17,13 $\pm$ 0,73	11,11 $\pm$ 0,67

* Valores médios do tempo de retenção relativo (t_R) em minutos do oligossacarídeo verbascose encontrados pelos autores Frias *et al.* (1994); Revilleza *et al.* (1990); Sosulki *et al.* (1982); Macrae & Zand-Moghaddam (1978)

** Valores médios do tempo de retenção relativo (t_R) em minutos do oligossacarídeo verbascose encontrados na presente Dissertação

Os cromatogramas obtidos por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts $\times$ tempo em minutos) dos diferentes tratamentos de feijão-comum e da água de maceração residual estão apresentados nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6. Verificou-se que as sequências dos picos cromatográficos foi rafinose, estaquiose e verbascose, o que está em concordância com vários autores (Vidal-Valverde *et al.*, 1998; Nwinuka *et al.*, 1997; Khalil & Mansour, 1995).

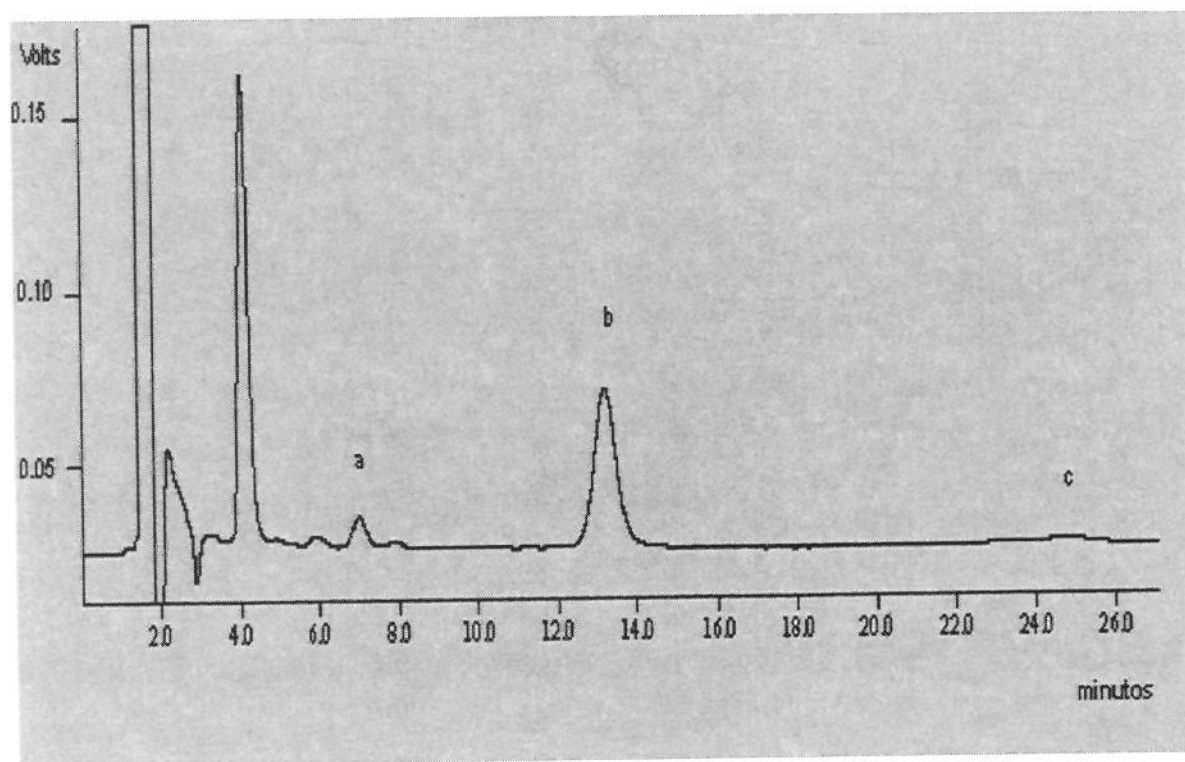


Figura 2. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts $\times$ tempo em minutos) no feijão-comum cru (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH_2 (12,5 $\times$ 4 mm), fase móvel acetonitrila-água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração

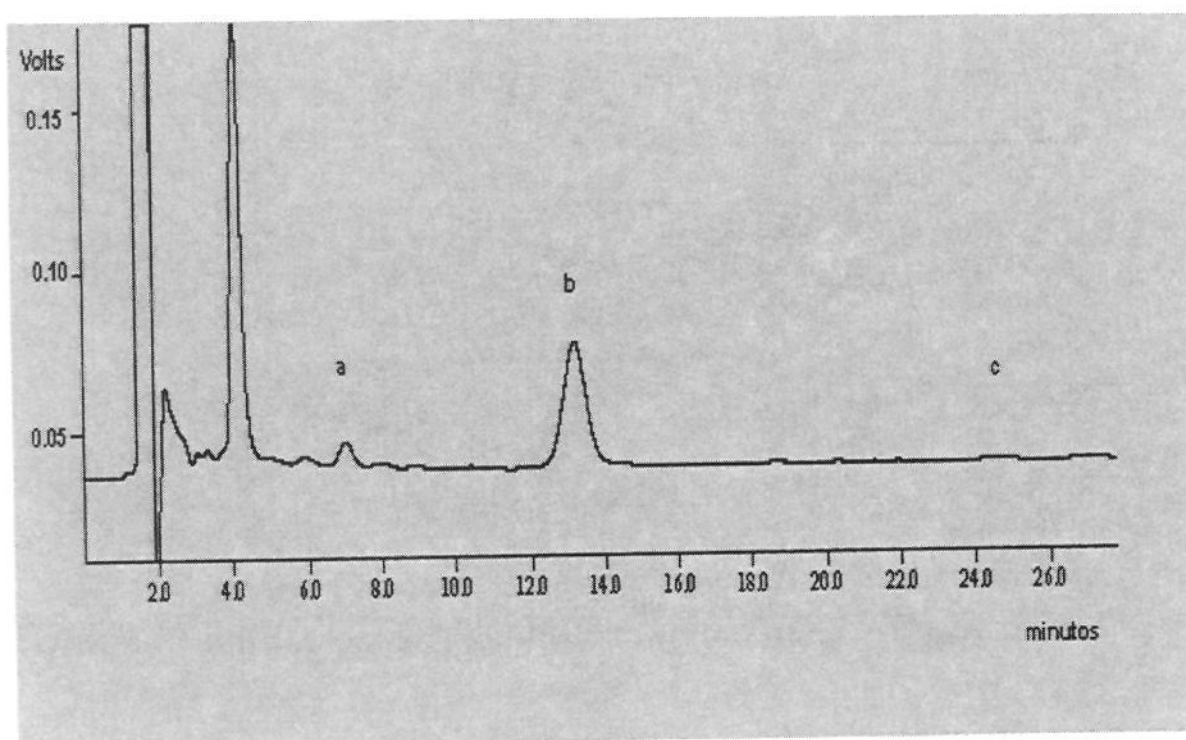


Figura 3. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts $\times$ tempo em minutos) no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99, cozido sem maceração. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH_2 (12,5 $\times$ 4 mm), fase móvel acetonitrila-água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração

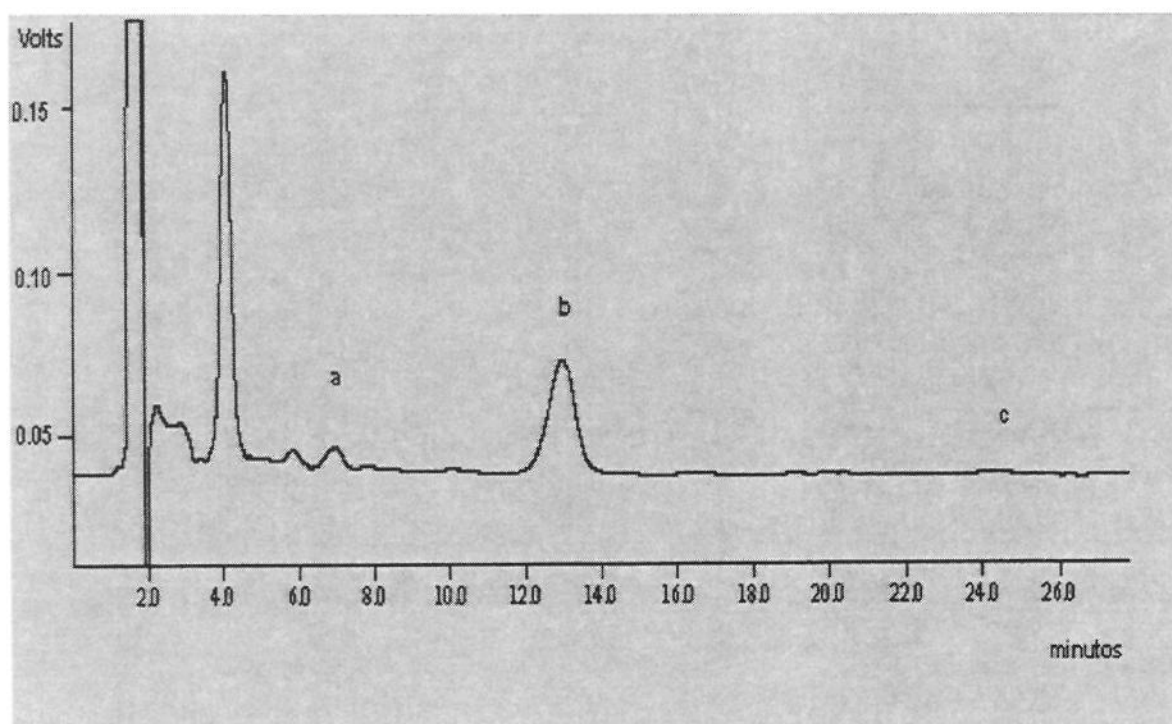


Figura 4. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts $\times$ tempo em minutos) no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99, cozido sem a água de maceração residual. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH_2 (12,5 $\times$ 4 mm), fase móvel acetonitrila-água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração

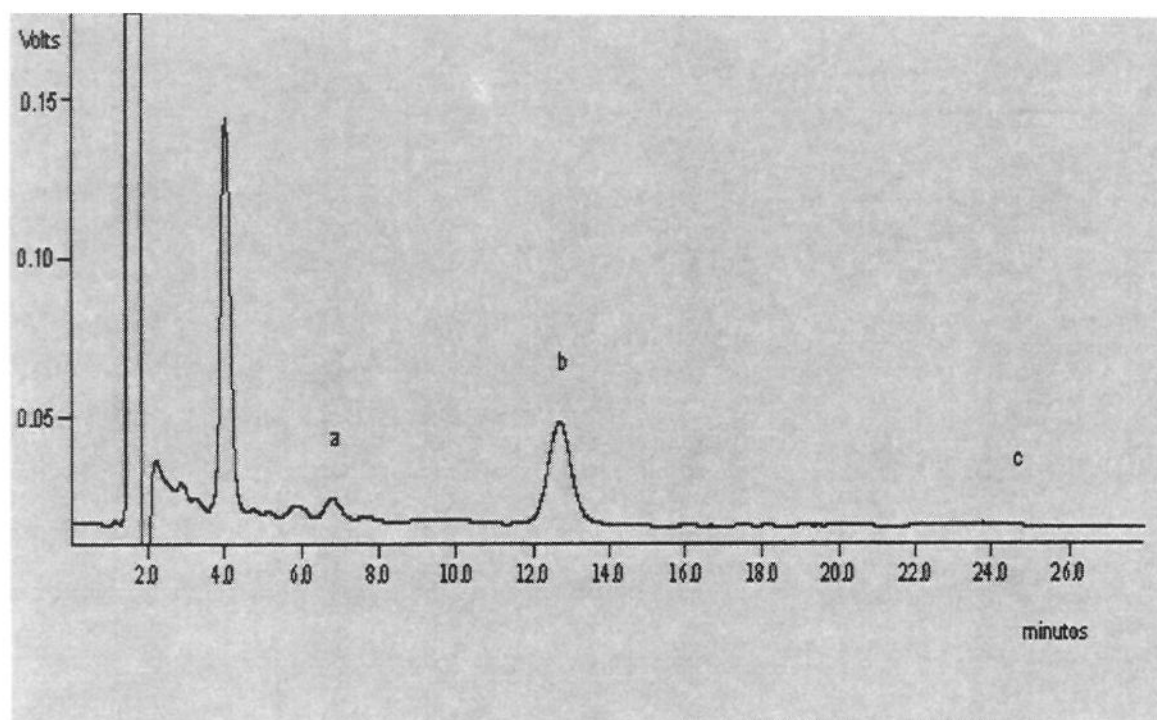


Figura 5. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts $\times$ tempo em minutos) no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99, cozido com a água de maceração residual. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH_2 (12,5 $\times$ 4 mm), fase móvel acetonitrila-água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração

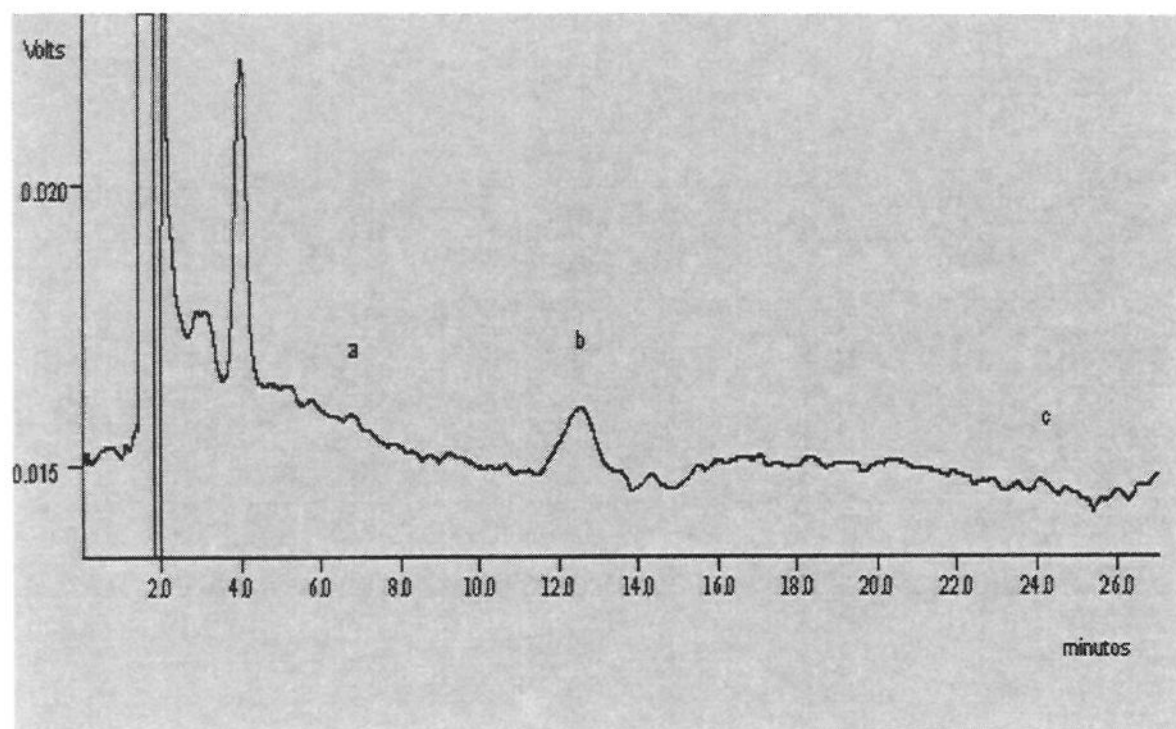


Figura 6. Cromatograma obtido por HPLC dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (resposta no detector em Volts $\times$ tempo em minutos) na água de maceração residual. **a:** rafinose, **b:** estaquiose, **c:** verbascose. Coluna NH_2 (12,5 $\times$ 4 mm), fase móvel acetonitrila-água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector índice de refração

Os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose, tomados em conjunto, representaram, em relação aos teores de açúcares totais, nos tratamentos feijão cru (FC), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM), respectivamente, as seguintes percentagens: 18,7; 21,6; 72,0 e 38,8. Segundo Abdel-Gawad (1993), os α -galactosídeos responsáveis pela flatulência em humanos, representam expressiva percentagem dos açúcares totais em leguminosas.

Com relação à participação percentual dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose, dentro dos açúcares totais, observou-se que a estaquiose apresentou percentagens bem maiores nos diferentes tratamentos, que variaram entre 16,1 a 62,5%, enquanto que a rafinose variou de 2,0 a 27,5% e a verbascose variou de 0,5 a 10,1%. Este fato está de acordo com alguns autores que, ao verificarem as concentrações de oligossacarídeos tipo rafinose em leguminosas, dentre elas o feijão-comum, encontraram que a estaquiose é o oligossacarídeo mais abundante em relação à rafinose e à verbascose (Rupérez, 1998; Borejszo & Khan, 1992) (Tabela 6).

Tabela 6. Percentagem de oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose em relação aos teores de açúcares totais nos diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca – lote 05/99.

Tratamento	Açúcares Totais (%)	Rafinose (%)	Estaquiose (%)	Verbascose (%)	OT• (%)
Feijão cru	20,03 ± 0,07	2,00	16,13	0,60	18,73
FCSM*	15,52 ± 0,09	2,06	19,01	0,52	21,59
FCSAM**	3,89 ± 0,03	7,71	62,47	1,80	71,98
FCCAM***	8,85 ± 0,00	5,42	32,20	1,13	38,75

• Oligossacarídeos totais: rafinose+estaquiose+verbascose

FCSM*- Feijão cozido sem maceração liofilizado

FCSAM**- Feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado

FCCAM***- Feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado

A maceração dos feijões crus e o tratamento térmico demonstraram serem complementares no preparo doméstico do feijão-comum, auxiliando na remoção dos oligossacarídeos tipo rafinose, principalmente quando a água de maceração residual foi descartada. Associadas a este fato, a extração alcoólica dos oligossacarídeos tipo rafinose com solução de etanol a 80% e as condições cromatográficas utilizadas possibilitaram obter resultados quantitativos que refletissem o efeito da maceração e da cocção nos diferentes tratamentos de feijão-comum.

4.3 Ensaio Biológico

Os valores encontrados no ensaio biológico com as dietas experimentais controle de caseína (CC), caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual (CSS), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM) estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7. Ganho de peso (g), consumo de proteína (g) e Quocientes de Eficiência da Dieta (QED) e de Eficiência Protéica Líquida (NPR) das dietas experimentais (média e desvio-padrão) cujas fontes protéicas eram caseína controle (CC), caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual (CSS), feijão cozido sem maceração liofilizado (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado (FCCAM), obtidos no ensaio biológico com ratos Wistar machos recém-desmamados, 8 ratos por dieta, durante 10 dias.

Dieta	Ganho de Peso	Consumo de Proteína	QED	NPR
Experimental	(g)	(g)		
CC*	52,2 ± 6,2 ^a	14,1 ± 1,3 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	4,1 ± 0,4 ^a
CSS**	48,5 ± 5,6 ^a	13,9 ± 0,6 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	3,9 ± 0,5 ^a
FCSM***	21,8 ± 4,0 ^b	9,1 ± 1,3 ^b	0,3 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,4 ^b
FCSAM****	18,8 ± 3,9 ^b	7,5 ± 0,9 ^c	0,3 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,6 ^b
FCCAM*****	18,2 ± 4,9 ^b	7,7 ± 0,8 ^c	0,3 ± 0,0 ^b	2,8 ± 0,2 ^b

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

*Dieta controle de caseína

**Dieta de caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual liofilizada

***Dieta de feijão cozido sem maceração liofilizado

****Dieta de feijão cozido sem a água de maceração residual liofilizado

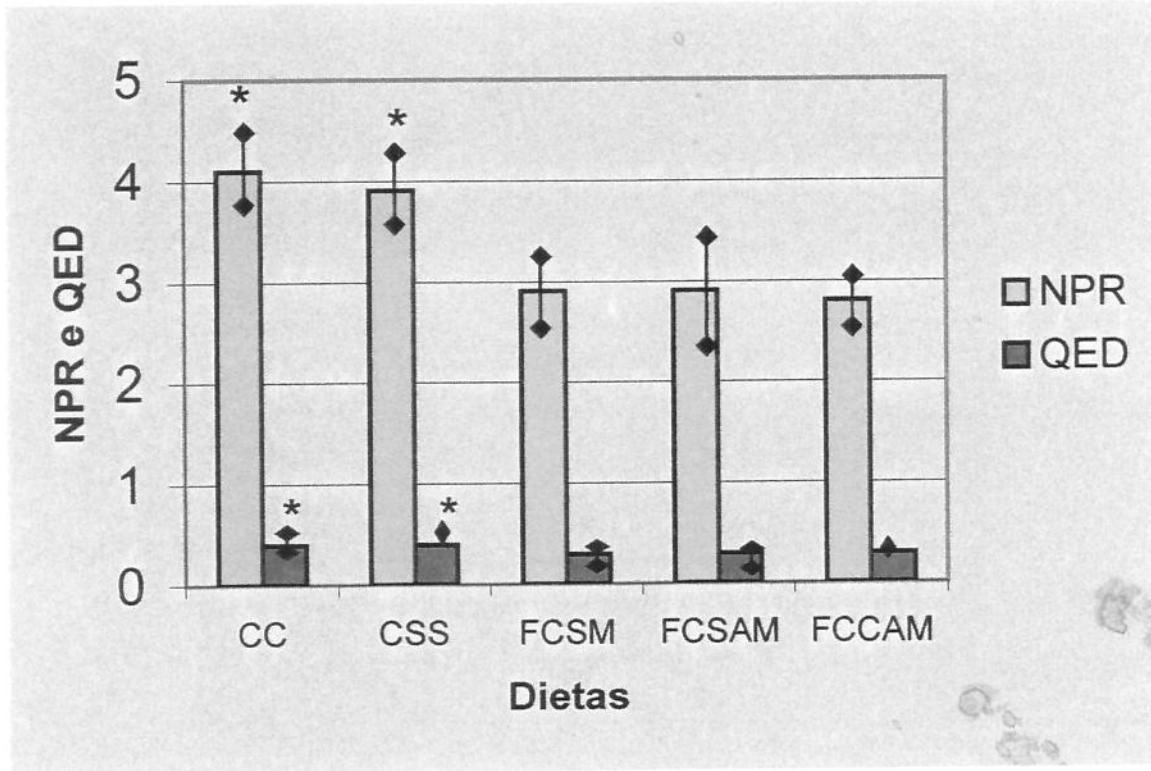
*****Dieta de feijão cozido com a água de maceração residual liofilizado

Para o tratamento aprotéico obteve-se $-4,7 \pm 1,2\text{g}$, como perda de peso média. Observou-se ainda que, as dietas CC e CSS não diferiram ($p>0,05$) em ganho de peso, consumo de dieta nem nos índices de eficiência da dieta (QED) e de eficiência líquida da proteína (NPR), mas diferindo das demais dietas experimentais cuja fonte protéica era feijão-comum, que apresentaram valores inferiores. Entre as dietas experimentais de feijão-comum também não foi encontrada diferença estatística nos dados avaliados, à exceção do consumo de proteína das dietas FCSAM e FCCAM que apresentaram valores ainda menores.

Verificou-se que a quantidade de fatores de flatulência presentes na água de maceração acrescidas à dieta de caseína não afetaram o valor nutritivo de uma proteína de alta qualidade, como a caseína. Os valores do NPR encontrados para as dietas de caseína estão em concordância com os autores Agunbiade & Longe (1999) e Hughes *et al.* (1996).

Alguns autores (Agunbiade & Longe, 1999; Fernández *et al.*, 1996), avaliando a composição de aminoácidos essenciais e a sua biodisponibilidade em leguminosas maceradas e cozidas, verificaram que o preparo das leguminosas aumentaram, consideravelmente, os índices de crescimento, como o NPR e o quociente de eficiência de conversão alimentar. Amaya *et al.* (1991) estudaram o efeito da frequência de recocção sobre o valor nutritivo da proteína e na disponibilidade de ferro em feijão preto cozido sem maceração (*Phaseolus vulgaris*), não encontrando diferença estatística significativa nos valores de NPR.

Na Figura 7, encontram-se os Quocientes de Eficiência da Dieta (QED) e de Eficiência Protéica Líquida (NPR), com vistas a visualizar a proporção entre os mesmos, de ratos Wistar machos recém-desmamados, 8 por dieta, cujas fontes eram caseína controle (CC), caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual (CSS), feijão cozido sem maceração (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual (FCCAM), durante 10 dias de experimento.



* $p < 0,05$

Figura 7. Quocientes de Eficiência da Dieta (QED) e de Eficiência Protéica Líquida (NPR), média e desvio-padrão, de ratos Wistar machos recém-desmamados, 8 por dieta, durante 10 dias alimentados com as dietas experimentais caseína controle (CC), caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração residual (CSS), feijão cozido sem maceração (FCSM), feijão cozido sem a água de maceração residual (FCSAM) e feijão cozido com a água de maceração residual (FCCAM).

No preparo doméstico do feijão-comum ocorrem várias alterações físicas e químicas, dentre elas a redução dos fatores antinutricionais e de fatores inconvenientes como os oligossacarídeos causadores de flatulência. Estas reduções são importantes para a nutrição humana e de animais, pois promovem uma maior utilização protéica e de carboidratos. O efeito da maceração e da cocção do feijão-comum nos teores dos oligossacarídeos tipo rafinose demonstrou que o descarte da água de maceração residual, ou seja, não absorvida pelos grãos, promoveu redução destes oligossacarídeos. Entretanto, verificou-se no ensaio biológico que os teores dos oligossacarídeos tipo rafinose presentes nos diferentes tratamentos de feijão-comum e na água de maceração residual não interferiram na utilização deste alimento. Os oligossacarídeos tipo rafinose podem causar flatulência em indivíduos susceptíveis, levando-os aos desconfortos abdominal e social. Porém, recentes estudos demonstram que benefícios podem ser atribuídos a estes oligossacarídeos. Eles podem ser utilizados como fonte de carboidratos e de energia por um grupo especial de bactérias presentes na região colônica do intestino grosso liberando produtos benéficos à saúde. São as bifidobactérias que, por efeito antagônico, inibem a atividade das bactérias putrefativas e reduzem a formação de produtos tóxicos da fermentação (Tomomatsu, 1997). Levando-se em consideração que os oligossacarídeos tipo rafinose não são de fato fatores antinutricionais e que podem até ser benéficos, o uso da maceração para reduzir estes oligossacarídeos torna-se questionável, pois em indivíduos menos susceptíveis ou aqueles resistentes à flatulência após ingestão de feijão-comum, os oligossacarídeos tipo rafinose poderiam ser utilizados como fatores bifidogênicos. Porém, torna-se necessário maiores investigações para elucidar os efeitos da maceração na redução dos fatores de flatulência, e uma futura extrapolação para humanos que se alimentam com dietas complexas.

5 CONCLUSÕES

1. A maceração do feijão-comum cru por 16 horas promoveu a absorção de água pelos grãos, proporcionando remoção dos fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose, dos teores de açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores e de amido em termos de substâncias sacarificáveis totais.

2. A utilização da maceração associada à cocção com descarte da água de maceração residual (tratamento feijão cozido sem água de maceração residual), ocasionou redução nos fatores de flatulência rafinose (25,0%), estaquiose (24,5%) e verbascose (41,7%), nos teores de açúcares totais (80,6%), açúcares redutores (58,2%) e açúcares não-redutores (90,3%) e de amido em termos de substâncias sacarificáveis totais (26,8%).

3. Os valores médios dos Quocientes de Eficiência da Dieta (QED) e de Eficiência Protéica Líquida (NPR) das dietas cuja fonte protéica era caseína, $0,4 \pm 0,0$ e $4,0 \pm 0,1$, e para as dietas cujas fontes protéicas era feijão-comum $0,3 \pm 0,0$ e $2,9 \pm 0,1$, respectivamente, demonstraram que as quantidades dos fatores de flatulência, os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose presentes na água de maceração residual acrescidas à dieta de caseína não afetaram o valor nutritivo de uma proteína de alta qualidade e não diminuíram a qualidade nutricional do feijão-comum, pois proporcionou crescimento adequado nos animais experimentais para dietas contendo leguminosas.

4. Tendo-se em vista que não houve alteração do valor nutricional do feijão-comum, o uso da maceração associada ao tratamento térmico para remoção dos oligossacarídeos tipo rafinose, tornar-se-ia discutível, pois para os indivíduos menos susceptíveis ou aqueles que consomem quantidades pequenas ou moderadas destes oligossacarídeos, que não são de fato fatores antinutricionais, poderiam atuar como agentes bifidogênicos, portanto exercendo uma função benéfica à saúde.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABDEL-GAWAD, A. S. Effect of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds. **Food Chemistry**, Barking, v.46, n.1, p.25-31, mar., 1993.
- 2 AGUNBIADE, S.O.; LONGE, O.G. Essential amino acid composition and biological quality of yam bean, *Sphenostylis stenocarpa* (Hochst ex A. Rich) harms. **Nahrung**, Berlin, v.43, n.1, p.22-24, feb., 1999.
- 3 ANGELUCCI, E.; CARVALHO, C.R.L.; CARVALHO, P.R.N.; FIGUEIREDO, I.B.; MANTOVANI, D.M.B.; MORAES, R.M. **Manual técnico de análises de alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. p.52-53.
- 4 AMAYA, H.; ACEVEDO, E.; BRESSANI, R. Effect of repeated cooking on iron availability and nutritive-value of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris*) protein. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.41, n.2, p.222-237, jun., 1991.
- 5 ANGELIS, R.C. Valor nutricional das proteínas: métodos de avaliação. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v.10, p.08-29, 1995.
- 6 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 10. ed., HORWITZ, W., ed. Washington D.C.: AOAC, 1970. p.64.
- 7 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 11. ed., HORWITZ, W., ed. Washington D.C.: AOAC, 1975. p.927- 928.

- 8 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis**. 16. ed., CUNNIFF, P.A., ed. Washington D.C.: AOAC, 1995. p.55.
- 9 ASSUMPÇÃO, R.M.V.; MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1968. p.328.
- 10 BAKR, A.A. Effect of Egyptian cooking methods of faba beans on its nutritive value, dietary protein utilization and iron deficiency anemia. 1. The role of main technological pretreatments. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.49, n.1, p.83-92, jan., 1996.
- 11 BALDINI, V.L.S.; DRAETTA, I.S.; PARK, Y.P. Purification and characterization of α -galactosidase from bean *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p.1766-1777, 1985.
- 12 BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R.E. Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.4, p.833-838, jul./ago., 1994.
- 13 BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R.E. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.48, n.4, p.349-365, dez., 1995.
- 14 BERGERET, G. **Curso de industrias agricolas: tecnica analitica**. Separata da Revista AGROS, Montevideo, v.7, n.129, p.98-100, 1937.

- 15 BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extration and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911- 917, 1959.
- 16 BOREJSZO, Z.; KHAN, K. Reduction of flatulence-causing sugars by high temperature extrusion of pinto bean starch fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.3, p.771-772, maio/jun., 1992.
- 17 BRAVO, L.; SIDDHURAJU, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of various processing methods on the in vitro starch digestibility and resistant starch content of Indian pulses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.46, n.11, p.4667-4674, nov., 1998.
- 18 BRESSANI, R.; NAVARRETE, D.A.; GARCIA-SOTO, A.; ELIAS, L.G. Culinary practices and consumption characteristics of common beans at the rural home level. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.38, n.4, p.925-934, dez., 1988.
- 19 CARVALHO, P.R.N. **Cromatografia líquida de alta eficiência aplicada à análise de alimentos**. Manual técnico. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1993. n.11. 82p.
- 20 CASAÑAS, F.; BOSCH, L.; PUJOLÀ, M.; SÁNCHEZ, E.; SORRIBAS, X.; NUEZ, F. Characteristics of a common bean landrace (*Phaseolus vulgaris*, L.) of great culinary value and selection of a commercial inbred line. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.79, n.5, p.693-698, abr., 1999.

- 21 CASTELLANOS, J.Z.; MALDONADO, H.G.; JIMENEZ, A.; MEJÍA, C.; RAMOS, J.J.M.; GALLEGOS, J.A.A.; HOYOS, G.; SALINAS, E.L.; EGUIARTE, D.G.; PÉREZ, R.S.; ACUNÃ, J.G.; VILLALOBOS, J.A.M.; HERNANDÉZ, P.F.; CÁCERES, B. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.) en México. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.47, n.2, p.163-167, jan., 1997.
- 22 CHAU, C.F.; CHEUNG, P.C.K. Effect of various processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch of two chinese indigenous legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.45, n.12, p.4773-4776, dez., 1997.
- 23 COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.p.185-238.
- 24 FERNANDÉZ, M.; LOPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; URBANO, G. Nutritional assessment of raw and processed faba bean (*Vicia faba*, L.) cultivar major in growing rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.44, n.9, p.2766-2772, set., 1996.
- 25 FERREIRA, M.C.; YOKOYAMA, L.P. Comportamento dos consumidores de feijão. In: VI REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 6. 1999, Salvador. **Anais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 1999. p.717-719.

- 26 FRIAS, J.; HEDLEY, C.L.; PRICE, K.R.; FENWICK, G.R.; VIDAL-VALVERDE, C. Improved methods of oligosaccharide analysis for genetic studies of legume seeds. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v.17, n.11, p.2469-283, dez., 1994.
- 27 FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; KOZLOWSKA, H.; GORECKI, R.; HONKE, J.; HEDLEY, C.L. Evolution of soluble carbohydrates during the development of pea, faba bean and lupin seeds. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v.203, n.1, p.27-32, jan., 1996.
- 28 HERNÁNDEZ, J.L.; GONZÁLEZ-CASTRO, M.J.; ALBA, I.A.; GARCÍA, C.C. High-performance liquid chromatographic determination of mono- and oligosaccharides in vegetables with evaporation light-scattering detection and refractive index detection. **Journal of Chromatographic Science**, Preston, v.36, n.6, p.293-298, jun., 1998.
- 29 HUGHES, J.C.; ACEVEDO, E.; BRESSANI, R.; SWANSON, B.G. Effects of dietary fiber and tannins on protein utilization in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, Amsterdam, v.29, n.3-4, p.331-338, abr./maio, 1996.
- 30 IDA, E.I.; SILVA, R.S.F.; RAO, C.S. Oligosaccharides of soybeans: problems and solutions. **Arquivos de Biologia e de Tecnologia**, Curitiba, v.24, n.4, 1981.
- 31 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, 1996, v.56, p.3-53: produção vegetal.

- 32 JACORZYNSKI, B. Der einfluss einer raffinose - diet und gekochter leguminosensamen auf einige prozesse im dickdarm der ratte. **Nahrung**, Berlin, v.31, n.10, p.971-980, dez., 1987.
- 33 JOHANSEN, H. N.; GLITSO, V.; KNUDSEN, K.E.B. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v. 44, n. 6, p. 1470-1474, jun, 1996.
- 34 JOOD, S.; MEHTA, U.; SINGH, R. Effect of processing on available carbohydrates in legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.34, n.3, p.417-420, maio/jun., 1986.
- 35 JOOD, S.; MEHTA, U.; SINGH, R; BHAT, C.M. Effect of processing on flatus-producing factors in legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.33, n.2, p.268-271, mar./abr., 1985.
- 36 KATARIA, A.; CHAUHAN, B.M. Contents and digestibility of carbohydrates of mung beans (*Vigna radiata*, L.) as affected by domestic processing and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.38, n.1, p.51-59, maio, 1988.
- 37 KATARIA, A.; CHAUHAN, B.M.; PUNIA, D. Effect of domestic processing and cooking methods on the contents of carbohydrates of amphidiploids (black gram × mung bean). **Food Chemistry**, Barking, v.36, n.1, p.63-72, maio, 1990.

- 38 KHALIL, A.H.; MANSOUR, E.H. The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. **Food Chemistry**, Barking, v.54, n.2, p.177-182, dez., 1995.
- 39 KNUDSEN, I.M. High-performance liquid chromatographic determination of oligosaccharides in leguminous seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.37, n.6, p.560-566, jun., 1986.
- 40 LARA, W.H. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. p.40-44.
- 41 LEES, R. **Manual de análisis de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1979. p.17, 124-125.
- 42 MACRAE, R.; ZAND-MOGHADDAM, A. The determination of the component oligosaccharides of lupinseeds by high pressure liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.29, n.12, p.1083-1086, dez., 1978.
- 43 MEREDITH, F. I.; THOMAS, C.A.; SNOOK, M. E.; HIMMELSBACH, D. S.; VAN-HALBEEK, H. Soluble carbohydrates, oligosaccharides and starch in lima bean seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.3, p.768-771, maio/jun., 1988.
- 44 MIZOTA, T. Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.313, p.31-35, maio, 1996.
- 45 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 seeds protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.38, n.1, p.18-24, jan./fev., 1990.

- 46 MULYOWIDARSO, R.K.; FLEET, G.H.; BUCKLE, K.A. Changes in the concentration of carbohydrates during the soaking of soybeans for tempe production. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.26, n.6, p.595-606, dez., 1991.
- 47 NWINUKA, N.M.; ABBEY, B.W.; AYALOGU, E.O. Effect of processing on flatus producing oligosaccharides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and the tropical african yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.51, n.3, p.209-218, set., 1997.
- 48 O'SULLIVAN, M.G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora – an overview. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.313, p.23-30, maio, 1996.
- 49 PARK, Y.K.; KOO, M.H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J.L. Investigations of the flavonoid aglycones of propolis by *Api mellifera* in Brazil. **Arquivos de Biologia e de Tecnologia**, Curitiba, v.40, n.4, p.97-106, 1997.
- 50 PEARSON, D. **Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1976. p.62-68.
- 51 PELLET, P. L.; YOUNG, V.R. **Nutritional Evaluation of Protein Foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154p.
- 52 PENNACCHIOTTI, M. I. Natural components of legumes responsible for flatulence. **Alimentos**, Santiago, v.14, n.4, p.60-70, jan., 1989.

- 53 PLAYNE, M.J.; CRITTENDEN, R. Commercially available oligosaccharides. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.313, p.10-22, maio, 1996.
- 54 PRICE, K.R.; LEWIS, J.; WYATT, G.M.; FENWICK, G.R. Flatulence: causes relation to diets and remedies. **Nahrung**, Berlin, v.32, n.6, p.609-626, nov./dez., 1988.
- 55 REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates – a review. **Food Chemistry**, Barking, v.13, n.1, p.25-68, jan., 1984.
- 56 REETA, G; VERMA, J. Identification of flatulence factors in some pulses. **Current Science**, Moscou, v.50, n.3, 144p., mar., 1981.
- 57 REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR., 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-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.123, n.11, p.1939-1951, nov., 1993.
- 58 REVILLEZA, M.J.R.; MENDONZA, E.M.T.; RAYMUNDO, L.C. Oligosaccharides in several Philippine indigenous food legumes: determination, localization and removal. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.40, n.1, p.83-93, jan., 1990.
- 59 RODRÍGUEZ-BÜRGER, A.P.; MASON, A.; NIELSEN, S.S. Use of fermented black beans combined with rice to develop a nutritious weaning food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.46, n.12, p.4806-4813, dez., 1998.

- 60 RUPÉREZ, P. Oligosaccharides in raw and processed legumes. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v.206, n.2, p.130-133, jul., 1998.
- 61 SÁNCHEZ-MATA, M.; TERUEL-PENUELA, M.; CÁMARA-HURTADO, M.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; TORIJA-ISASA, M.E. Determination of mono-, di-, and oligosaccharides in legumes by high-performance liquid chromatography using an amino-bonded silica column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.46, n.9, p.3648-3652, ago., 1998.
- 62 SATHE, S.K.; DESPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K.; RACKIS, J.J. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.21, p.41-93, abr., 1984.
- 63 SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **World Reviews in Nutrition and Dietetics**. Basel, v.60, n.46, p.132-198, jan., 1989.
- 64 SOSULKI, F.W.; ELKOWICZ, L.; REICHERT, R.D. Oligosaccharides in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.2, p.498-502, nov., 1982.
- 65 TEZOTO, S.S.; SGARBIERI, V.C. Protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C, v.38, n.4, p.1152-1156, abr., 1990.

- 66 TOMOMATSU, H. Ingestion of oligosaccharides increases the bifidobacteria population in the colon, which in turn contributes to human health in many ways. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.63-67, out., 1997.
- 67 TRUGO, L.C.; RAMOS, L.A.; TRUGO, N.M.F.; SOUZA, M.C.P. Oligosaccharide composition and trypsin inhibitor activity of *Phaseolus vulgaris* and the effect of germination on the alpha-galactoside composition in the human colon. **Food Chemistry**, Barking, v.36, n.1, p.53- 61, maio, 1990.
- 68 VALENZUELA, M.R.C.; SGARBIERI, V.C. Influence of various dry bean fractions, c.v. Carioca 80, on diet efficiency and dietary protein utilization. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.36, n.2, p.141-151, nov., 1990.
- 69 VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J.; VALVERDE, S. Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.93, n.5, p.547-550, maio, 1993.
- 70 VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J.; SOTOMAYOR, C.; DIAZ-POLLAN, C.; FERNANDEZ, M.; URBANO, G. Nutrients and antinutritional factors in faba beans as affected by processing. **Zeitschrift fur Lebensmittel- Untersuchung und Forschung**, Berlin, v.207, n.2, p.140-145, ago., 1998.
- 71 VIJAYAKUMARI, K.; SIDDHURAJU, P.; JANARDHANAN, K. Effect of soaking, cooking and autoclaving on phytic acid and oligosaccharide contents of the tribal pulse, *Mucuna monosperma* DC. Ex. wight. **Food Chemistry**, Barking, v.55, n.2, p.173-177, jun., 1996.

- 72 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, p.343-348, mar., 1973.
- 73 YASHIMA, T. Benefits of bifidobacteria to human health. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.313, p.36-42, maio, 1996.