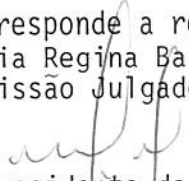


Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Maria Regina Barbieri de Carvalho e aprovada pela Comissão Julgadora em 02.05.96


Presidente da Banca

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA PARCIAL E AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES ANTINUTRICIONAIS DOS INIBIDORES DE TRIPSINA-
QUIMOTRIPSINA DO FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.)
'IAC-Carioca 80 SH'.

Maria Regina Barbieri de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de
Doutor em Ciência de Alimentos.

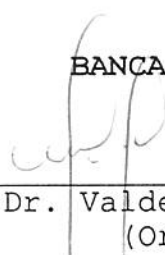
Campinas

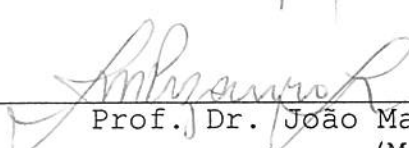
- 1996 -


UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

9608034

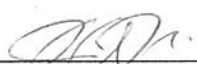
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador)


Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior
(Membro)


Prof. Dr. Ricardo Gonçalves Coelho
(Membro)

Suplente
Prof. Dr. Flávio Finardi Filho
(Membro)


Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
(Membro)

Suplente
Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Membro)

Hélia Harumi Sato
Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro)

Campinas, 02 de maio de 1996.

"Ainda que eu tiver o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que eu tiver toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver o amor, eu nada serei".

(1Cor 13,2)

Ao *Nelson Luiz*, companheiro de todas as horas e
Aos meus filhos *Rafael*, *Marina* e *Gabriel*,
que fazem dos meus sonhos realidade...

DEDICO

Aos meus pais *José* e *Devina*, que me
mostraram em todos os momentos
como agir diante da vida.

Aos meus irmãos *Olga* e *José Augusto*
pela alegria do convívio.

Ao Professor *Fawzi* (em memória)
pelo constante otimismo.

MINHA GRATIDÃO E HOMENAGEM

Aos meus amigos *Liana, Tânia, Fátima*
e *Miguel, Maria Aparecida*, e a todos
da II Comunidade Neocatecumenal na
pessoa do responsável *Sr. Venor*, por
terem proporcionado uma convivência
familiar e solidariamente se fizeram
presentes em todas as horas difíceis
ao longo desses anos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que fez o passado, o que acontece agora e o que acontecerá depois.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela orientação constante, amizade e compreensão, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wanderley José de Melo, pelo exemplo de dedicação científica e incentivo.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP-Jaboticabal, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. José Laércio Sartori, Chefe do Departamento de Tecnologia da FCAVJ/UNESP, como também aos professores deste Departamento, pelo apoio humano e por toda colaboração prestada.

Aos Professores João Martins Pizauro Jr., José Fernando Durigan, Eliana G. M. Lemos, Manoel Victor Franco Lemos e Jesus Ap. Ferro, pelas sugestões e ilimitado apoio, tão indispensáveis em situações difíceis.

Aos Professores Pedro A. de Souza e Hirasilva B.A. de Souza, pelas facilidades oferecidas.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e, à CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Lewis J. Greene, coordenador do Centro de Química de Proteína da Faculdade de Medicina-USP, Ribeirão Preto, pela realização das análises de composição em aminoácidos.

Aos funcionários, estagiários e colaboradores dos Departamento de Tecnologia da FCAVJ/UNESP e do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da FEA/UNICAMP, pela amizade e disponibilidade em servir.

Aos Professores Sergio Nascimento Kronka e Antônio Sergio Ferraudó pelo apoio na realização das análises estatísticas.

Às amigas Marcia Regina Stech e Poliana Fernanda Giachetto pela constante alegria e otimismo.

À Sra. Renata P.R. de Campos e Sra. Elisabete Y.O. Ogassavara pelo auxílio nos serviços de digitação.

Ao Sr. José Barbieri da Silva pelo esmero na confecção das fotografias.

Aos professores e funcionários da FCAVJ/UNESP, FEA/UNICAMP e a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que fosse possível a concretização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
Lista de Quadros	v
Lista de Figuras	viii
RESUMO	01
SUMMARY	03
1. INTRODUÇÃO	05
2. REVISÃO DA LITERATURA	07
2.1. Fracionamento das proteínas do feijão	07
2.2. Composição em aminoácidos do feijão.....	09
2.3. Digestibilidade das proteínas	12
2.4. Proteínas tóxicas ou antinutricionais do feijão	18
2.4.1. Inibidores de tripsina	18
2.4.2. Fitohemaglutininas	31
2.5. Inativação dos fatores antinutricionais	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Material	44
3.2. Obtenção das frações protéicas	44
3.3. Inativação térmica dos inibidores de tripsina e das fitohemaglutininas	46
3.3.1. Aquecimento em autoclave	46
3.3.2. Aquecimento em água fervente	46
3.3.3. Tratamento térmico das frações utilizadas no ensaio biológico	48
3.4. Purificação dos inibidores de tripsina da fração albumina	49
3.4.1. Aquecimento da fração albumina	49

	Página
3.4.2. Cromatografia de afinidade	49
3.5. Métodos Analíticos	51
3.5.1. Composição química centesimal	51
3.5.2. Composição em aminoácidos	52
3.5.3. Atividade inibidores de tripsina.....	52
3.5.4. Atividade hemaglutinante	53
3.5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	53
3.5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	54
3.5.7. Determinação do peso molecular (PM)	56
3.5.8. Efeito da concentração do inibidor na inibição da atividade da tripsina e da α -quimotripsina	56
3.6. Avaliação dos efeitos antinutricionais dos inibidores	58
3.6.1. Preparo das dietas	58
3.6.2. Condições dos ensaios biológicos.....	59
3.6.3. Eficiência alimentar (EA) e efeito tóxico da proteína (EP)	60
3.6.4. Balanço de nitrogênio (BN), digesti- bilidade verdadeira (DV), valor bio- lógico (VB) e quociente de utilização líquida da proteína (NPU)	61
3.6.5. Experimento pareado	62
3.7. Tratamento estatístico	63
4. RESULTADOS	64
4.1. Composição centesimal da farinha integral	64
4.2. Fracionamento da farinha	65
4.2.1. Rendimento das frações protéicas e conteúdo em carboidrato	65

	Página
4.2.2. Atividade específica dos inibidores de tripsina e hemaglutinante, das frações protéicas isoladas	67
4.3. Efeito do aquecimento em autoclave, na inativação térmica dos inibidores de tripsina e das fitohemaglutininas presentes no grão e farinha	69
4.4. Efeito do aquecimento em água fervente, na inativação térmica dos inibidores de tripsina e das fitohemaglutininas presentes no grão, farinha e frações protéicas isoladas	74
4.5. Inativação térmica dos inibidores de tripsina em função do pH	75
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, das frações protéicas tratadas e não tratadas termicamente	77
4.7. Composição em aminoácidos das frações protéicas tratadas e não tratadas	80
4.8. Purificação dos inibidores de tripsina da fração albumina	82
4.9. Caracterização dos inibidores de tripsina da fração albumina	84
4.9.1. Comportamento eletroforético	84
4.9.2. Composição em aminoácidos	84
4.9.3. Determinação do peso molecular	89
4.9.4. Efeito da concentração do inibidor sobre a atividade da tripsina e da α -quimotripsina	89
4.10. Avaliação dos efeitos antinutricionais dos inibidores.....	95

	Página
4.10.1. Consumo de dieta e ganho em peso.....	95
4.10.2. Balanço de Nitrogênio	99
4.10.3. Digestibilidade verdadeira (DV), valor biológico (VB) e utilização líquida da proteína (NPU)	101
4.11. Experimento Pareado	103
5. DISCUSSÃO	105
5.1. Composição centesimal	105
5.2. Caracterização das frações protéicas	106
5.3. Inativação térmica dos inibidores de tripsina e fitohemaglutinina	110
5.4. Caracterização química/estrutural dos inibidores de tripsina da fração albumina.	114
5.5. Efeito dos fatores antinutricionais na quali- dade da proteína.	121
6. CONCLUSÕES.	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	127

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1. Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico.	59
2. Composição centesimal da farinha integral de feijão 'IAC-Carioca-80 SH'.....	64
3. Valores médios e os desvios padrão relativos à quantidade de cada fração (g), à quantidade de proteína extraída (g), ao conteúdo de proteína (%), e ao conteúdo de carboidrato (%) obtidos com o fracionamento da farinha integral do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.....	66
4. Atividade específica dos inibidores de tripsina (UTI) e das fitohemaglutininas (AH) nas frações isoladas da farinha integral do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.....	68
5. Efeito do tratamento térmico em autoclave (121°C) sobre a inativação dos inibidores de tripsina dos grãos e da farinha do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', macerados e não macerados.....	70
6. Efeito do tratamento térmico em autoclave (121°C) sobre a inativação das fitohemaglutininas dos grãos e farinha do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', macerados e não macerados.....	72

	Página
7. Efeito do aquecimento em água fervente (30 minutos) na inativação dos inibidores de tripsina do grão, farinha e frações protéicas isoladas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'	75
8. Influência do pH de extração na inativação térmica dos inibidores de tripsina, quando aquecidos a 97°C.	76
9. Composição em aminoácidos das frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80SH' após terem sido tratadas a 97°C por 30 minutos e das não tratadas.	81
10. Purificação dos inibidores de tripsina da fração albumina do feijão 'IAC Carioca 80 SH'	83
11. Composição em aminoácidos da fração albumina não precipitada pelo aquecimento e dos inibidores de tripsina do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'	88
12. Quantidade de proteína (g) e atividades totais dos inibidores de tripsina e das hemaglutininas para 100g de dieta.	96

13. Consumo de dieta, ganho em peso e eficiência alimentar, para ratos alimentados com dietas contendo frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', tratadas e não tratadas termicamente, ao fim do balanço de cinco dias..... 98
14. Balanço de nitrogênio, de ratos alimentados com dietas contendo frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80SH' tratadas e não tratadas termicamente, ao fim do balanço de cinco dias 100
15. Digestibilidade verdadeira (DV), valor biológico (VB) e utilização líquida da proteína (NPU) em ratos alimentados com dietas contendo frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' tratadas e não tratadas termicamente, ao fim do balanço de cinco dias. . 102
16. Teste pareado em ratos alimentados com dieta teste (fração albumina não tratada) e dieta referência (caseína)..... 104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Esquema do fracionamento utilizado para obtenção das frações protéicas.	45
2. Porcentagens de inativação térmica dos inibidores de tripsina (UTI/mg amostra) dos grãos macerados (GM) e não macerados (GNM) e da farinha macerada (FM) e não macerada (FNM), do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', autoclavados a 121°C, pelo período de até 30 minutos.	71
3. Porcentagens de inativação térmica da atividade hemaglutinante (título hemaglutinante/mg amostra) dos grãos macerados (GM) e não macerados (GNM), e da farinha macerada (FM) e não macerada (FNM), do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', autoclavados a 121°C, pelo período de até 30 minutos. ...	73
4. Porcentagens de inativação térmica dos inibidores de tripsina (UTI/mg de amostra) extraídos em função do pH e aquecidos a 97°C, pelo período de até 20 minutos.	78
5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações protéicas não tratadas e tratadas a 97°C por 30 minutos.	79

	Página
6. Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração albumina (perfil 1) e da fração albumina não precipitada pelo aquecimento (perfis 2 e 3).	85
7. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade.	86
8. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. 1- proteína padrão; 2- fração albumina; 3- fração albumina não precipitada pelo aquecimento.	90
9. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. 1- proteína padrão; 2- fração albumina; 3- inibidores purificados por cromatografia de afinidade.	90
10. Efeito da concentração dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade sobre a atividade da tripsina.	92
11. Efeito da concentração dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade sobre a atividade da α -quimotripsina.	92
12. Efeito da concentração dos inibidores da fração albumina não precipitada pelo aquecimento sobre a atividade da tripsina.	93

13. Efeito da concentração dos inibidores da
fração albumina não precipitada pelo aque-
cimento sobre a atividade da α -quimiotri-
psina..... 94

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar a estabilidade térmica das fitohemaglutininas e dos inibidores de tripsina presentes no feijão 'IAC-Carioca 80 SH'; purificar e caracterizar esses inibidores, além de avaliar biologicamente os seus efeitos antinutricionais. Os estudos de inativação térmica dos fatores antinutricionais foram realizados com o tratamento térmico dos grãos, das farinhas e das frações protéicas. Os inibidores foram purificados por cromatografia de afinidade e pelo aquecimento da fração albumina, tendo sido caracterizados quanto ao comportamento eletroforético, composição em aminoácidos, peso molecular e quanto à inibição da tripsina e da α -quimotripsina. Os efeitos antinutricionais dos inibidores foram avaliados através de ensaios biológicos, utilizando-se dietas contendo mistura de caseína e cada uma das frações protéicas, tratadas ou não termicamente. Os resultados mostraram que o tratamento térmico, após maceração, foi mais eficiente para inativação dos fatores antinutricionais. As fitohemaglutininas foram menos estáveis ao tratamento térmico do que os inibidores de tripsina-quimotripsina e a eficiência da inativação térmica foi dependente da forma em que a amostra foi tratada. Os três inibidores purificados por cromatografia de afinidade apresentaram alto conteúdo de $\frac{1}{2}$ cistina e baixo teor de glicina. Inibiram tanto a tripsina como a α -quimotripsina na proporção de

1:1, assemelhando-se ao inibidor do tipo Bowman-Birk porém, com pesos moleculares mais elevados. Na fração albumina não precipitada pelo aquecimento, os inibidores permaneceram ativos e apresentaram comportamento não linear tanto quanto à inibição da tripsina como à da α -quimotripsina. Enquanto a fração albumina não aquecida teve efeito letal para ratos recém-desmamados, as frações protéicas tratadas termicamente melhoraram sua qualidade nutricional, principalmente pela inativação das fitohemaglutininas. As dietas contendo frações protéicas tratadas termicamente e com diferentes níveis de atividade para os inibidores forneceram índices nutricionais semelhantes entre si, o que permitiu a avaliação da pequena importância desses inibidores, como fator antinutricional.

SUMMARY

The objective of this work was to analyse the thermal stability of the phytohemagglutinins and of the trypsin inhibitors present in the bean 'IAC-Carioca 80 SH', purify and characterize these inhibitors, besides biologically evaluating its antinutritional effects. The thermal inactivation studies of the antinutritional factors were performed by heat-treatment of the grains, the flours and of the protein fractions. The inhibitors were purified by affinity chromatography and by heat-treatment of the albumin fraction, and were characterized as to the electrophoretic behavior, amino acids composition, molecular weight as well as the inhibition against trypsin and α -chymotrypsin. The antinutritional effects of the inhibitors were evaluated by biological assays, utilizing diets containing mixtures of casein and each of the protein fractions submitted or not to heat-treatment. The results showed that the heat-treatment after maceration, was more efficient in the inactivation of the antinutritional factors. The phytohemagglutinins were less stable to heat-treatments than the trypsin-chymotrypsin inhibitors and the efficiency of the heat-treatment was dependent on the form in which the samples were treated. The three inhibitors presented high half-cystine and low glycine contents. They inhibited trypsin as well as α -chymotrypsin in the 1:1 ratio, however they

unheated precipitated albumin fraction, the inhibitors remained active and showed a non linear inhibition of the trypsin and α -chymotrypsin enzymes. While the albumin had lethal effect on weanling rats, the proteic fraction thermically treated improved its nutritional values due to the phytohemagglutinins inactivation. The diets with heat treated protein fractions and trypsin inhibitors with different activity levels had the same nutritional improvement, what allowed to determine the relative importance of such inhibitors as an antinutritional factor.

1. INTRODUÇÃO

A família das leguminosas compreende inúmeras espécies dentre as quais as mais importantes são o feijão, a ervilha, a lentilha e a soja, utilizadas como alimento pela população mundial. No Brasil, o feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) é, entre todas, a leguminosa mais consumida.

O conteúdo protéico desta leguminosa varia de 18% a 29% e sua alta ingestão diária, imposta por problemas econômicos ou culturais, tornou-a responsável pelo suprimento de parte significativa, não só das proteínas, como dos carboidratos e outros nutrientes, para uma grande parcela da população mundial.

O desenvolvimento de cultivares cujo valor nutritivo, especialmente o protéico, seja de real importância na alimentação, constitui um programa onde as informações químicas, bioquímicas e biológicas dos seus constituintes, são de grande valia na orientação de decisões, assim como na apreciação dos resultados obtidos.

Dentre os cultivares já desenvolvidos, o 'Carioca 80', obtido pelo Instituto Agrônomo de Campinas, possui qualidade protéica superior aos outros feijões do tipo Carioca, que são os mais consumidos no Brasil (Tezoto e Sgarbieri, 1990). A presença de um halo de cor alaranjada nos grãos deste feijão provocava uma depreciação pelos comerciantes, o que motivou o desenvolvimento de um novo cultivar, denominado 'IAC-Carioca 80 SH' (São Paulo,

Secretaria da Agricultura, 1988). A qualidade protéica e a biodisponibilidade de metionina deste cultivar foram estudadas por Coelho (1993) enquanto as características nutricionais de sua fibra alimentar, por Raupp (1994).

Dentre os fatores que têm limitado o valor biológico e nutricional das proteínas do feijão está a presença de proteínas tóxicas e antinutricionais, com destaque para os inibidores de proteases e as fitohemaglutininas, ainda não estudados neste novo cultivar.

Os inibidores são substâncias que prejudicam a digestão protéica, levando a um aumento na produção de enzimas pelo pâncreas enquanto as fitohemaglutininas interagem com as células da mucosa intestinal prejudicando o processo de absorção dos nutrientes, contribuindo para o efeito tóxico (Liener, 1980; Liener e Kakade, 1980). A inativação destas substâncias é um procedimento necessário e fundamental à qualidade nutricional dos grãos de feijão.

Desse modo este trabalho objetivou avaliar a estabilidade térmica dos inibidores de tripsina e das fitohemaglutininas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', purificar e caracterizar os inibidores de tripsina contidos em sua fração albumina e avaliar biologicamente os efeitos antinutricionais dos inibidores, presentes em suas frações protéicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fracionamento das proteínas do feijão

Com base em sua solubilidade em água, em soluções salinas diluídas, em álcool e em soluções ácidas ou alcalinas diluídas, as proteínas das leguminosas foram classificadas em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, respectivamente (Pant e Tulsiani, 1969; Sathe et al., 1978; Sgarbieri, 1979; Utsumi, 1992).

A eficiência de extração do nitrogênio total do grão é bastante variável em função da espécie ou cultivar e das condições de extração. De acordo com Sgarbieri (1979), as porcentagens de extração são influenciadas pela temperatura, tipo e pH do solvente, dada a influência dos mesmos na solubilidade das proteínas. Este autor, ao estudar a extratibilidade das proteínas do feijão 'Rosinha G2' em função do pH e da força iônica do meio, observou que em soluções ácidas ($\text{pH} < 3$) ou alcalinas ($\text{pH} > 8$) extraiu-se entre 85% e 95% do nitrogênio total da farinha integral, com menor extratibilidade na faixa de pH entre 3,5 e 5,0. Observou ainda, que na extração fracionada com vários solventes, 48,0% do nitrogênio total era extraído com água destilada, 25,6% com solução 0,5M de NaCl e 19,3% com tampão borato de sódio pH 10,0 contendo 0,5% de mercaptoetanol e 0,5% de lauril sulfato de sódio, perfazendo uma extração de 93% do

nitrogênio total. Os 7% restantes foram atribuídos às proteínas estruturais que permaneceram fortemente ligadas ao resíduo insolúvel. O aquecimento dos grãos, a 97°C por 5 minutos, diminuiu em praticamente 50% a solubilidade em água do conteúdo protéico e tornou-o insolúvel após 60 minutos.

Durigan (1985), estudando 12 cultivares de feijão, verificou que a extratibilidade da proteína, com solução 0,2M de NaCl, após reextração com o mesmo solvente situou-se entre 62,26% e 84,14%.

As proteínas do tipo globulina e albumina representam, juntas, a maior porcentagem do nitrogênio total dos grãos de feijão (Sathe et al. 1978; Utsumi, 1992).

Estudando a solubilidade das proteínas de três cultivares de feijão, Pant e Tulsiani (1969) observaram que a globulina representou de 56% a 61% da fração nitrogenada do grão, a albumina de 5,5% a 7,0%, a prolamina de 1% a 3% e a glutelina de 9% a 14%.

Estudos realizados por Lanfer-Marquez e Lajolo (1981) mostraram que as globulinas e prolaminas contribuíram, respectivamente, com 22,4% e 1,7% dos totais de proteínas extraídos do feijão 'Carioca-80'. Coelho (1993) estimou que as glutelinas compreendem cerca de 1/4 das proteínas extraídas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.

Sgarbieri et al. (1979), ao fracionarem as proteínas de quatro cultivares de feijão obtidas por extração em NaCl a 2%,

diálise e centrifugação, observaram que a globulina era a fração predominante, representando de 35% a 46% do total, e que a relação globulinas/albuminas variou entre 2,2 e 3,7. O nitrogênio não recuperado representou de 20,8% a 36,7% do total da proteína.

Sgarbieri e Galeazzi (1990) demonstraram que a solubilidade das proteínas dos grãos, de 55 cultivares de feijão, em soluções de NaCl a 2% variou de 68% a 85%, e a proporção entre globulinas e albuminas de 1,00 a 3,31. As globulinas representaram cerca de 48% do nitrogênio total extraído, enquanto que as albuminas corresponderam a 21% deste total.

O feijão tem o valor biológico e nutricional de suas proteínas limitado pela presença de fatores antinutricionais, como os inibidores de proteases, pela deficiência em aminoácidos sulfurados, pela sua baixa digestibilidade, pela reduzida disponibilidade biológica dos aminoácidos limitantes e pela presença de compostos termo-resistentes, como taninos (Liener, 1980; Fernandez et al., 1982).

2.2. Composição em aminoácidos do feijão

Vários pesquisadores têm demonstrado que as proteínas dos grãos de feijão são deficientes em aminoácidos sulfurados e contêm elevados teores de lisina. Baldi e Salamini (1973) estudaram a composição em aminoácidos das proteínas de 22

cultivares de *Phaseolus* e encontraram valores para a metionina variando de 0,70% a 1,55%, para a $\frac{1}{2}$ cistina de 0,55% a 2,28% e para a lisina de 5,60% a 8,23%. Os valores encontrados por Puzstai et al. (1979), para 13 cultivares de feijão comum e expressos em g/100g proteína, foram de 1,1 a 1,8 para a metionina; de 0,7 a 0,9 para a $\frac{1}{2}$ cistina e de 5,1 a 7,5 para a lisina. Kanamori et al. (1982) mostraram que os teores de lisina, leucina e dos aminoácidos aromáticos, encontrados em duas variedades de feijão, superaram os padrões de referência da Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO, 1973).

Bressani (1988) destacou a limitação da metionina e o alto conteúdo de lisina do feijão o que adquire grande importância nutricional quando suas proteínas são utilizadas para complementar as proteínas de cereais deficientes em lisina.

Os conteúdos de metionina biodisponível nas proteínas do feijão são relativamente baixos e podem variar de 23,9% a 58,0%, dependendo da cultivar (Evans e Bauer, 1978; Antunes e Sgarbieri, 1979; Durigan, 1985; McDonough et al., 1989; Tezoto e Sgarbieri, 1990; Coelho, 1993).

A suplementação com metionina melhora o valor de dietas cujo conteúdo protéico é fornecido por feijões.

Moraes-Santos e Dutra de Oliveira (1972), ao alimentarem ratos com feijão integral e frações protéicas do cultivar Goiano Precoce, suplementadas ou não com 0,2% de DL-

metionina, observaram que a proteína crua causava a morte dos animais, em proporções variadas, e que a suplementação com metionina diminuía ou eliminava esta letalidade. Sgarbieri (1979) observou que a adição de 3% de DL-metionina e 2% de L-cisteína às frações protéicas autoclavadas do feijão 'Rosinha G2' melhorou os valores do PER, tanto para a farinha integral como para as frações protéicas, as quais responderam melhor à adição de metionina.

Analisando a composição em aminoácidos das proteínas do grão descorticado e das frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', Coelho (1993) observou que as proteínas apresentaram quantidades elevadas de metionina disponível, em relação a outros cultivares, e que os teores dos aminoácidos essenciais lisina, valina, treonina, triptofano, leucina, isoleucina e fenilalanina não eram limitantes à qualidade de suas proteínas, por excederem os da proteína referência da FAO/WHO (1973). Dentre as frações isoladas, as glutelinas foram as mais ricas em metionina e lisina, enquanto que as albuminas apresentaram teores mais elevados de $\frac{1}{2}$ cistina e triptofano. As globulinas apresentaram-se deficientes em aminoácidos sulfurados e triptofano. Concluiu que o desenvolvimento de variedades com maiores teores de glutelinas e menores em globulinas, em especial a G1, poderá resultar em grãos cujas proteínas tenham valor biológico superior às atualmente existentes.

2.3. Digestibilidade das proteínas

O menor valor nutricional das proteínas do feijão, em relação ao de outras proteínas alimentícias, também pode ser devido à resistência intrínseca das mesmas à hidrólise enzimática (Nilsen et al., 1988).

A globulina G1, proteína de reserva mais abundante no feijão, tem se mostrado resistente à hidrólise *in vitro*, pela pepsina e quimotripsina (Seidl et al., 1969; Liener e Thompson, 1980; Deshpande e Nielsen, 1987). A baixa susceptibilidade desta proteína à hidrólise enzimática foi atribuída à sua estrutura compacta (Chang e Satterlee, 1981) e a impedimentos estruturais (Romero e Ryan, 1978).

É também conhecido que o tratamento térmico leva a aumento na sua digestibilidade, *in vitro* e *in vivo* (Liener e Thompson, 1980; Deshpande e Damodaran, 1989). Isso em consequência de mudanças na estabilidade estrutural, induzindo ao rompimento das estruturas terciárias e quaternárias sem, contudo, causar grandes alterações na secundária, o que é um dos fatores responsáveis pelos altos valores de digestibilidade, observados após o aquecimento (Deshpande e Damodaran, 1989; Carbonaro et al., 1992).

A relação entre a estrutura e a digestibilidade *in vitro* da globulina G1, após tratamento a 99°C por 15 minutos, foi estudada por Deshpande e Damodaran (1989). Observaram que, quando

se aumentava o tempo de digestão, a proteína aquecida continuava a ser hidrolisada a peptídeos com menores pesos moleculares, o que não acontecia com a proteína nativa.

O aumento na susceptibilidade à proteólise, pelas proteínas da farinha de feijão, branco e marrom, após o tratamento térmico (autoclavagem por 20 minutos), foi quantificado por Carbonaro et al. (1992) que utilizaram a ultrafiltração em membranas para separar todas as moléculas de pesos moleculares menores que 30.000 daltons. A extensão da proteólise, medida pela porcentagem de nitrogênio total recuperado nas frações menores do que 30.000, aumentou nas amostras tratadas pelo aquecimento, sendo que 82% e 75% do nitrogênio total passou ao ultrafiltrado, para o feijão branco e marrom, respectivamente, enquanto que somente 20% e 30% foram recuperados após a hidrólise das amostras cruas. A digestibilidade do feijão branco e do marrom quando crus que era de 74,0% e 71,5%, respectivamente, após o tratamento térmico aumentou para 80,5% e 77,3%. Lanfer-Marquez e Lajolo (1981) constataram que os valores da digestibilidade *in vitro* variavam de 17% a 40% para as proteínas de amostras cruas de feijão e aumentavam para 69%-72%, após aquecimento a 121°C, por 30 minutos.

Entre as frações protéicas do feijão, a albumina tem mostrado baixa digestibilidade, que não é aumentada com o aquecimento (Sgarbieri e Whitaker, 1982). Esta fração contém os

se aumentava o tempo de digestão, a proteína aquecida continuava a ser hidrolisada a peptídeos com menores pesos moleculares, o que não acontecia com a proteína nativa.

O aumento na susceptibilidade à proteólise, pelas proteínas da farinha de feijão, branco e marrom, após o tratamento térmico (autoclavagem por 20 minutos), foi quantificado por Carbonaro et al. (1992) que utilizaram a ultrafiltração em membranas para separar todas as moléculas de pesos moleculares menores que 30.000 daltons. A extensão da proteólise, medida pela porcentagem de nitrogênio total recuperado nas frações menores do que 30.000, aumentou nas amostras tratadas pelo aquecimento, sendo que 82% e 75% do nitrogênio total passou ao ultrafiltrado, para o feijão branco e marrom, respectivamente, enquanto que somente 20% e 30% foram recuperados após a hidrólise das amostras cruas. A digestibilidade do feijão branco e do marrom quando crus que era de 74,0% e 71,5%, respectivamente, após o tratamento térmico aumentou para 80,5% e 77,3%. Lanfer-Marquez e Lajolo (1981) constataram que os valores da digestibilidade *in vitro* variavam de 17% a 40% para as proteínas de amostras cruas de feijão e aumentavam para 69%-72%, após aquecimento a 121°C, por 30 minutos.

Entre as frações protéicas do feijão, a albumina tem mostrado baixa digestibilidade, que não é aumentada com o aquecimento (Sgarbieri e Whitaker, 1982). Esta fração contém os

ausência do inibidor de tripsina em extrato protéico de soja aumentou a susceptibilidade da proteína à proteólise (Habeeb, 1966). Lanfer-Marquez e Lajolo (1981) sugeriram que o inibidor de tripsina, da fração albumina do feijão, é resistente ao calor e forma com a proteína um agregado de alto peso molecular resistente à hidrólise, durante o tratamento térmico. Sgarbieri (1979) concluiu que tanto a presença de inibidores ativos, como a de pontes dissulfídicas nas proteínas da fração albumina, afetam negativamente a proteólise enzimática. Em estudo posterior, Sgarbieri (1980) verificou ausência de correlação entre a atividade antiproteolítica e a digestibilidade das proteínas, em grãos de diversas leguminosas. A digestibilidade das proteínas, nas sementes cruas, variou de 25,0% a 64,3% e não se correlacionou com a atividade do inibidor de tripsina dos extratos ou com sua digestibilidade, após o cozimento dos grãos.

A reduzida digestibilidade da fração albumina (79%), após o aquecimento, também foi atribuída às reações entre carboidratos e proteínas, com a formação de complexos não digeríveis (Lanfer-Marquez e Lajolo, 1988).

O efeito negativo dos taninos na digestibilidade da proteína do feijão cozido, dado pela habilidade dos mesmos em se complexarem com proteínas tornando-as parcialmente indisponíveis à hidrólise (Bressani e Elias, 1980), foi confirmado por Carbonaro et al. (1992). Estes autores cozinham feijão branco, na presença de ácido tânico (10mg/100g de

inibidores de tripsina (Seidl et al., 1969; Gomes et al., 1979) e praticamente toda $\frac{1}{2}$ cistina do feijão (Sgarbieri e Galeazzi, 1990).

A importância das ligações dissulfídicas na estabilidade da estrutura da proteína e na diminuição da susceptibilidade à hidrólise enzimática foi verificada para as proteínas de diferentes fontes alimentares. O rompimento das ligações S-S com o conseqüente aumento na digestibilidade *in vitro* foi mostrado por Boonvisut e Whitaker (1979) e por Hamaker et al. (1987) para as proteínas da soja e para as do sorgo, por Sgarbieri (1979) para as frações albumina e globulina do feijão 'Rosinha G2', e por Reddy et al. (1988), para a β -lactoglobulina.

A pequena quantidade de grupos tióis livres (menos de 10% do total de $\frac{1}{2}$ cistina), determinada em amostras de feijão antes do tratamento com o agente redutor DTT (ditiotreitól), indica que quase todos resíduos de $\frac{1}{2}$ cistina dos hidrolisados estavam comprometidos com a formação de ligações dissulfídicas. A completa redução da $\frac{1}{2}$ cistina, realizada somente com o uso de uréia e DTT, leva à conclusão que fatores estruturais intrínsecos são os responsáveis pela inacessibilidade das pontes dissulfídicas ao agente redutor (Sgarbieri, 1979).

A responsabilidade dos inibidores de tripsina na baixa hidrólise das proteínas do feijão integral ou quando estas estão isoladas, mesmo após o aquecimento, foi reportado por Lanfer-Marquez e Lajolo (1981), e por Deshpande e Damodaran (1990). A

proteína), e mostraram haver redução na digestibilidade, que se aproximou do valor obtido (77,3%) para o feijão pigmentado cozido.

Os taninos podem influenciar, além da digestibilidade das proteínas (Barroga et al., 1985, Deshpande et al., 1982), a reatividade da cistina. A interação dos taninos com as proteínas do feijão, que pode ocorrer em grande extensão durante o tratamento térmico, pode proteger parcialmente as ligações dissulfídicas da ação de agentes redutores (Carbonaro et al., 1992).

A quantidade de nitrogênio excretado nas fezes, por ratos alimentados com feijão, é 2,6 a 4,1 vezes maior que a excretada quando eles consomem caseína (Jalali, 1992) e pode limitar o valor nutricional de suas proteínas. Bender e Mohammadiha (1981) atribuíram o aumento de 5,3 vezes no nitrogênio fecal eliminado por ratos, quando comparado com o da dieta aprotéica, à descamação das células epiteliais da mucosa intestinal. Fairweather-Fait et al. (1983), alimentando ratos com dieta contendo feijão cozido, observaram que estes excretaram 3 vezes mais nitrogênio fecal do que os mantidos em dieta de caseína, o que foi atribuído ao aumento da atividade da flora intestinal.

Oliveira e Sgarbieri (1986) monitoraram a radioatividade presente nas fezes de ratos, após injeção intraperitonal de ^{14}C -glicina, mantidos em dietas de caseína,

feijão cozido e feijão cru. Observaram que os valores foram respectivamente, 2, 5 e 10 vezes maiores que os daqueles que receberam dieta aprotéica, mostrando correlação linear e positiva com o nitrogênio excretado nas fezes. Concluíram que a excreção fecal de nitrogênio endógeno se constitui em importante fator de redução indireta da digestibilidade.

Lanfer-Marquez e Lajolo (1988) marcaram as proteínas do feijão com ^{15}N e observaram que os animais que receberam dieta contendo feijão integral excretavam mais nitrogênio nas fezes enquanto as frações protéicas causavam apenas um leve aumento, em relação aos ratos alimentados com caseína.

O aumento do nitrogênio fecal ocasionado pela descamação das células epiteliais intestinais tem sido atribuído às fitohemaglutininas presentes no feijão, que, atuando nas microvilosidades da mucosa intestinal, acabam por provocar acentuadas lesões nessas células, interferindo na absorção e, conseqüentemente, na utilização de nutrientes (Jaffé e Brücher, 1972). A ruptura das células epiteliais do intestino acarreta em perda de nitrogênio endógeno (Bender e Mohammadiha, 1981).

Um estudo para verificar a influência do feijão cozido na quantidade e origem do nitrogênio endógeno fecal de ratos, através da marcação das proteínas com ^3H -aminoácidos e dos ácidos nucléicos com ^3H -nucleosídeos, foi realizado por Jalali (1992). Estimando a quantidade de nitrogênio fecal endógeno a partir da proporção entre o nitrogênio endógeno total e a radioatividade

das fezes, em relação à dieta aprotéica, demonstrou que os animais alimentados com feijão excretaram 133%-166% mais nitrogênio endógeno. Os resultados obtidos com a marcação dos ácidos nucléicos, mediante injeção intraperitoneal de [G-³H]-adenosina, confirmaram que o metabolismo de nucleosídeos em ratos alimentados com feijão é maior sem, contudo, mostrar evidências de aumento significativo na descamação da mucosa intestinal.

2.4. Proteínas tóxicas ou antinutricionais do feijão

2.4.1. Inibidores de tripsina

Isolamento e Caracterização

Os inibidores de tripsina ocorrem naturalmente em várias espécies de plantas, tais como leguminosas, gramíneas e tubérculos. Nas leguminosas se encontram principalmente nos grãos, o que sugere que são aí sintetizados durante a sua formação e que não são translocados para as outras partes das plantas (Kapoor e Gupta, 1978).

Smith e Circle (1972), assim como Liener e Kakade (1980), atribuíram as seguintes funções fisiológicas a esses inibidores nas plantas: manutenção da dormência por serem agentes reguladores; controle das proteínas endógenas, e prevenção ao ataque de microrganismos e insetos predadores. Durante a germinação da soja, os inibidores ativos se concentram no

cotilédone e vão perdendo a atividade durante a germinação não inibindo, portanto, o sistema proteolítico enzimático dos grãos maduros (Richardson, 1977; Kapoor e Gupta, 1978). Sharma e Sehgal (1992) observaram redução de 65% na atividade dos inibidores de tripsina dos grãos do feijão-fava (*Vicia fava*), 48 horas após a germinação.

Os inibidores representam cerca de 2% do conteúdo total das proteínas da soja (Sgarbieri e Whitaker, 1982) e 10% das proteínas da batata (Ryan, 1968). Para o feijão comum, Abramova e Chernikov (1964) encontraram conteúdo de 0,27%. Gomes et al. (1979) reportaram que os inibidores de tripsina correspondem a 2,7% da proteína da fração albumina do feijão 'Navy', enquanto Whitaker e Sgarbieri (1981) encontraram valor de 0,24% na fração albumina dos grãos de feijão 'Rosinha G2' e Rayas-Duarte et al. (1992) encontraram 1,69% na fração albumina do feijão 'Great Northern'. Os inibidores de tripsina constituíram 1,69% da proteína do extrato ácido do feijão comum (Wu e Whitaker, 1990).

A ação dos inibidores de tripsina, contra o ataque de insetos e bactérias ao tomate e à batata, foi estudada por Bishop et al. (1984) e Ryan et al. (1985). Este mecanismo de defesa é necessário pois, conforme Birk et al. (1963), estes invasores têm a capacidade de produzir enzimas proteolíticas (tripsina e quimotripsina) que podem se ligar aos inibidores específicos da planta, e inativá-las. Hilder et al. (1987) mostraram a resistência do tabaco ao ataque de insetos herbívoros quando esta

planta recebeu um gene codificador do inibidor de tripsina do feijão guandu.

Os inibidores de enzimas proteolíticas, presentes nas leguminosas, têm sido agrupados em duas famílias, a do inibidor de Kunitz, que foi inicialmente isolado da soja e cristalizado por Kunitz (1946), e a do inibidor Bowman-Birk, descoberto por Bowman (1946) e purificado e caracterizado por Birk (1961). Devido ao interesse despertado por esses inibidores, vários deles foram isolados do feijão por Pusztai (1966), Wilson e Laskowski (1973), Whitley e Bowman (1975), Birk (1976), Gomes et al. (1979), Whitaker e Sgarbieri (1981), Sgarbieri e Whitaker (1981), Wu e Whitaker (1991) e Rayas-Duarte et al. (1992). Estes estudos evidenciaram inibidores do tipo Bowman-Birk, atuando principalmente sobre as enzimas proteolíticas associadas à serina. Outro grupo de inibidores são os que atuam sobre a α -amilase de origem animal e de insetos, também relatados em feijão por Jaffé (1973), Powers e Whitaker (1977), Sgarbieri (1980) e Finardi Filho e Lajolo, (1988).

A caracterização dos inibidores de proteases, em função de suas propriedades químicas, físicoquímicas, estruturais e inibitórias, foi revisada por Sgarbieri e Whitaker (1982), Birk (1985) e Burns (1987) e destacaram os seguintes parâmetros:

- o inibidor de Kunitz apresenta peso molecular de 21.000 a 24.000 e contém 198 resíduos de aminoácidos, e duas ligações dissulfídicas por molécula. É termolábil, e contém

maiores teores de glicina, valina, leucina, isoleucina e arginina do que o inibidor de Bowman-Birk, tendo ação estequiométrica (1:1) em relação a tripsina mas não em relação a quimotripsina.

- o inibidor de Bowman-Birk apresenta peso molecular de 7.975 e contém 71 resíduos de aminoácidos. Contém sete ligações dissulfídicas por molécula, o que torna sua estrutura bastante rígida e com grande estabilidade ao calor, a ácidos e a álcalis. Sua composição em aminoácidos revela altos níveis de serina, ácido aspártico e $\frac{1}{2}$ cistina, e baixos teores de glicina, valina e metionina. Apresenta centros de ligações independentes para tripsina e para quimotripsina e inibe estequiometricamente 1 mol de tripsina e 1 mol de quimotripsina por mol de inibidor.

Os inibidores de tripsina têm sido isolados dos extratos de feijão utilizando-se aquecimento (Sgarbieri, 1979), fracionamento com sulfato de amônio, filtração em Sephadex, cromatografia em DEAE-celulose (Tsukamoto et al., 1983), cromatografia de afinidade (Whitaker e Sgarbieri, 1981; Xavier Filho e Campos, 1983; Wu e Whitaker, 1990; Rayas-Duarte et al., 1992).

Sgarbieri (1979) encontrou maior atividade inibidora da tripsina e da quimotripsina nas albuminas do feijão 'Rosinha G2', obtidas após aquecimento desta fração por 15 minutos a 97°C, que coagulava 65-70% das proteínas presentes. Os inibidores permaneciam em solução, na fração não coagulável, sem sofrer inativação. Nestas condições, os inibidores eram purificados 9,2

vezes em relação ao extrato bruto. A precipitação com sulfato de amônio e filtração em gel de Sephadex G-50 elevou o grau de purificação em 31,4 vezes, com uma recuperação de 59,5% em relação ao extrato bruto. Rayas-Duarte et al. (1992) purificaram os inibidores do feijão 'Great Northern' cerca de 1,1 vezes, com recuperação de 93,6% da atividade, quando aqueceram a fração albumina a 75°C, por 15 minutos.

Tsukamoto et al. (1983) isolaram três inibidores do feijão 'Kintoky', usando o fracionamento em sulfato de amônio, filtração em gel de Sephadex G-100 e cromatografia em DEAE-celulose.

Ishikawa et al. (1985) isolaram inibidores de protease do feijão 'Adzuki' (*Vigna angularis*) através de extração ácida da farinha, saturação com sulfato de amônio e precipitação com ácido tricloroacético. Após filtração em Sephadex G25 e cromatografia em coluna de DEAE-celulose, foram obtidas três frações. Os inibidores denominados ABI, ABIIa e ABIIc, apresentavam pesos moleculares de 9.166, 8.661 e 8.756 daltons, e continham 82, 78 e 79 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A sequência de aminoácidos foi determinada e estes inibidores foram classificados como do tipo Bowman-Birk, devido ao alto conteúdo de $\frac{1}{2}$ cistina e baixos pesos moleculares.

A tripsina covalentemente ligada a um suporte sólido pode ser usada para purificar inibidores de tripsina (Fritz et al., 1971). Esta técnica, denominada cromatografia de afinidade,

tem facilitado o isolamento de inibidores de proteases, especialmente iso-inibidores, onde as resinas de afinidade são usadas para acoplar proteínas à Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (Wu e Whitaker, 1990).

Whitaker e Sgarbieri (1981) isolaram três inibidores de tripsina-quimotripsina do feijão 'Rosinha G2'. O procedimento adotado incluiu o fracionamento das proteínas em função da solubilidade e purificação dos inibidores contidos na fração albumina, por cromatografia de afinidade. Neste estágio, a recuperação foi de 61,4% e a purificação de 60,1 vezes. Quando os eluatos, que continham os inibidores, foram reaplicados na mesma coluna a purificação aumentou para 92,0 vezes. Os inibidores obtidos foram separados por cromatografia em coluna DEAE-celulose e CM-celulose e apresentaram composição em aminoácidos muito semelhante, ou seja, não continham triptofano e valina, apresentavam só um resíduo de metionina, baixos teores de glicina, alanina, leucina e tirosina e altos níveis de serina, treonina e $\frac{1}{2}$ cistina.

Wu e Whitaker (1990) purificaram quatro inibidores de protease, do feijão 'Linden', denominados R(A), R(B1), R(B2) e R(C), por cromatografia de afinidade, de troca iônica com DEAE-Sepharose e CM-celulose e cromatografia hidrofóbica com fenil-Sepharose. Concluíram que todos os inibidores eram ácidos, com ponto isoelétrico variando de pH 4,66 a 5,09 e apresentavam composição em aminoácidos similares, com alto conteúdo de $\frac{1}{2}$

cistina. O peso molecular foi de 8.510 a 9.210, quando estimado pela composição em aminoácidos, e de 18.800 a 20.400, quando determinado por eletroforese em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS).

Apesar da cromatografia de afinidade se apresentar bastante específica para o isolamento dos inibidores, ela pode permitir modificações aos inibidores de tripsina pela proteólise (Xavier Filho e Campos, 1983). Assim, tem-se proposto o uso de anidrotripsina, na qual a serina do sítio ativo é convertida em dihidroalanina, evitando-se modificações indesejáveis (Xavier Filho e Campos, 1983; Puzstai et al., 1988, 1991).

Os inibidores de tripsina, estáveis ao calor, também foram purificados de feijão 'Great Northern', por Rayas-Duarte et al. (1992) que utilizaram cromatografia de DEAE celulose, de fenil-Sepharose e de afinidade com anidrotripsina-Sepharose. O fator de purificação foi 13,8 vezes e a recuperação de 23,4%. O peso molecular estimado foi de 18.000 (eletroforese contendo SDS), e os iso-inibidores isolados apresentaram ponto isoelétrico entre pH 4-5 com alguns inibindo tanto a tripsina, como a quimotripsina.

Importância Nutricional

A ocorrência natural dos inibidores de proteases tem merecido grande atenção dos pesquisadores devido aos seus

possíveis efeitos no valor nutritivo dos grãos, em especial das leguminosas, e ao organismo que os ingere. Osborne e Mendel (1917) foram os primeiros a observarem que a soja crua não promovia o crescimento normal de ratos. Estudos realizados por Bowman (1944) e Ham e Sandstedt (1944) mostraram a existência de substâncias termolábeis, que inibiam a atividade proteolítica da tripsina. Westfall e Hauge (1948) observaram que o aquecimento destruía este inibidor, concluindo que esta substância era a responsável pela baixa utilização das proteínas da soja crua. A presença dos inibidores de tripsina no trato intestinal de ratos e aves, leva a um aumento na produção de enzimas pelo pâncreas e à hipertrofia deste órgão (Chernick et al., 1948; Lyman e Lepkovasky, 1957; Booth et al., 1960; Gertler et al., 1967). A administração oral do inibidor de tripsina cristalino da soja, em ratos, levou-os a uma secreção pancreática elevada de proteases, lipase e amilase, acompanhada por aumento na atividade das enzimas digestivas, no intestino delgado (Lyman e Lepkovasky, 1957).

A relação entre a atividade do inibidor de tripsina e a hipertrofia pancreática, tem sido atribuída ao fato de que a secreção pancreática é controlada pelo nível de tripsina ativa no trato intestinal (inibição tipo "feed back") e que a ação do inibidor de tripsina neutraliza esse efeito supressivo ao combinar-se com a tripsina (Green e Lyman, 1972; Liener, 1979a). Kakade et al. (1973) afirmaram que 40% da hipertrofia do

pâncreas, de ratos alimentados com proteína de soja crua, era proporcionada pelo inibidor de tripsina. A hipertrofia também pode ser causada por fração da soja, isenta de inibidores ativos (Saxena et al., 1963; Liener, 1979b). A presença de proteína intacta ou de proteínas desnaturadas, que se combinam irreversivelmente com a tripsina, mesmo após a remoção dos inibidores, também levam a aumento na secreção pancreática (Schneeman e Lyman, 1975; Johnson et al., 1977; Liener, 1979a).

Estudo realizado por Meyer e Kelly (1976) procurou avaliar o efeito da qualidade da proteína na secreção pancreática de cães. Quando proteínas intactas (albumina de ovo, caseína, hemoglobina e albumina de soro bovino) foram injetadas no intestino, observaram pequeno aumento na secreção pancreática, que era elevado quando estas proteínas eram ingeridas. Concluíram que a resposta pancreática é regulada pelo produto de hidrólise da proteína. Scheeman et al. (1977) observaram, em ratos, que a secreção de enzimas pancreáticas em resposta à intubação intragástrica de uma dieta contendo caseína, é mais efetiva do que aquela contendo caseína hidrolisada. Segundo estes autores, a estimulação do pâncreas, para a produção de proteases, parece ser dependente da presença de proteína intacta.

A utilização de farinha de feijão cru na alimentação de ratos tem como resultado a morte dos animais experimentais. Antunes e Sgarbieri (1980) observaram que ratos recém desmamados, quando alimentados com farinha crua do feijão 'Rosinha', morreram

antes de completarem 21 dias de dieta em consequência da presença de fatores tóxicos e antinutricionais. Durigan e Sgarbieri (1987) avaliaram a qualidade nutricional de doze cultivares de feijão e verificaram que ratos adultos Wistar, com peso médio inicial de 225g, alimentados com farinha integral de grãos crus como única fonte protéica, morreram no período de 3,8 ('Goiano precoce') a 8,4 dias ('Aroana'). A mistura da farinha integral com caseína, ainda que não acarretasse a morte dos ratos, evidenciou prejuízo no aproveitamento da ração e no desenvolvimento dos animais, expressos por diminuições no ganho em peso e na digestibilidade, valor biológico e utilização líquida, das proteínas. As atividades dos inibidores de tripsina, presentes nos grãos, não se correlacionaram com a relação perda de peso/proteína ingerida, indicando a presença de outros componentes que causavam a toxicidade.

A toxicidade de quinze cultivares de feijão e de um cultivar de *Vigna unguiculata* foi estudada por Mancini Filho e Lajolo (1981) que não encontraram qualquer relação entre o conteúdo de inibidores de tripsina e a toxicidade, ao injetarem, intraperitonalmente, os extratos destas leguminosas em camundongos.

Sgarbieri (1979) conduziu dois ensaios para avaliar o efeito antinutricional do inibidor de tripsina, isolado do feijão 'Rosinha G2', quando adicionado à dietas de caseína para ratos. Realizou um balanço de nitrogênio de cinco dias, com dietas

contendo 10% de caseína e 1% de inibidor, e um outro, em que a concentração de caseína foi de 5% e a adição de inibidor foi feita na base de 3% da proteína. Não encontrou, nos dois ensaios, qualquer efeito do inibidor sobre o ganho em peso pelos ratos ou sobre os índices de valor nutricional da caseína. A administração dos inibidores, em suas formas quimicamente puras, em experimentos de curta duração, não interferiu, com o crescimento normal dos animais experimentais .

A significância dos níveis de inibidor de tripsina tem sido questionada. Rackis et al. (1975) observaram em um experimento de 28 dias, em que ratos alimentados com farinha de soja, na qual 55% a 69% da atividade inibidora da tripsina havia sido eliminada, não apresentaram hipertrofia pancreática, verificando valores máximos de PER (quociente de eficiência protéica) com 80% de inativação do inibidor.

Os efeitos dos inibidores de protease, em ratos mantidos em dietas, por longo tempo (dois anos), contendo baixos níveis do inibidor de tripsina têm levado a alteração fisiológica do pâncreas (Struthers et al., 1983; Gumbmann et al., 1985; Liener et al., 1985; Spangler et al., 1985). Struthers et al. (1983) observaram que ratos alimentados com dietas contendo isolado protéico de soja, com baixa capacidade inibidora, apresentaram maior aumento no peso do pâncreas por unidade de inibidor de tripsina do que os alimentados com farinha de soja crua. McGuinness et al. (1980) e Gumbmann et al. (1984) sugeriram

que o hormônio colecistoquinina, que regula a secreção pancreática em ratos, seria o estimulador do aumento do pâncreas, assim como um fator de desenvolvimento de câncer pancreático, quando os ratos são alimentados com farinha de soja crua ou com baixos níveis do inibidor.

Em uma compilação de resultados, de diversos autores, Burns (1987) mostrou que não há correlação entre a susceptibilidade da espécie ou da linhagem animal com a hipertrofia ou hiperplasia, ou com o desenvolvimento de lesões pancreáticas, após prolongada alimentação com soja crua ou inibidores de tripsina. Hipertrofia ou hiperplasia pancreática não foi observada nas espécies canina, suína e humana. As lesões pancreáticas foram observadas em ratos Wistar, mas não em camundongos ou hamsters.

Liener e Kakade (1980) observaram correlação direta entre o tamanho do pâncreas e sua resposta aos inibidores de tripsina da soja crua, concluindo que a hipertrofia pancreática só se estabelece em espécie animal na qual o pâncreas excede a 0,3% do peso corporal.

A hipertrofia pancreática, que conduz à perda de proteína endógena secretada pelo pâncreas, pode ser responsável por parte da depressão do crescimento em ratos alimentados com soja crua (Booth et al., 1960). Tendo-se que as proteínas pancreáticas são enzimas ricas em aminoácidos sulfurados, o

efeito resultante seria a perda desses aminoácidos pelo organismo, que são os limitantes nesta leguminosa.

Em se tratando de nutrição humana, tem-se proposto que as tripsinas humanas (α e β) seriam diferentes, quanto a susceptibilidade à inibição (Coan e Travis, 1971; Figarella et al., 1975). Feeney et al. (1969) avaliaram a atividade *in vitro* de inibidores de várias fontes sobre a tripsina humana e observaram que esta é fracamente inibida pelo inibidor proveniente da soja, mas fortemente pelo do feijão 'Lima'.

Holm et al. (1988) realizaram um estudo para investigar os efeitos de farinhas de soja com diferentes níveis de atividade inibidora, sobre a atividade enzimática duodenal e o possível efeito regulatório dos hormônios gastrointestinais nas respostas pancreáticas, em 11 jovens saudáveis. Observaram que as atividades das enzimas quimotripsina e tripsina no duodeno, foram inibidas pela soja crua, enquanto que o isolado protéico contendo baixo nível de inibidor e a soroalbumina bovina aumentaram a atividade dessas enzimas. O nível plasmático de colecistoquinina aumentou significativamente durante a infusão intraduodenal de soroalbumina bovina, mas não durante a infusão com soja contendo inibidor. Concluíram que as mudanças das atividades enzimáticas no duodeno com a infusão de soja crua, podem ser devidas à inibição das enzimas, alterações nas secreções enzimáticas ou combinação desses efeitos.

Em contraste à capacidade dos inibidores de proteases em causar lesões pancreáticas, aplicações médicas destes inibidores têm sido propostas. Estudos epidemiológicos têm identificado, nas leguminosas, a possibilidade de serem agentes protetores na diminuição da ocorrência de câncer de mama, colon e próstata, em populações vegetarianas (Birk, 1985) e no tratamento de pancreatites crônicas (Pap et al., 1983). Troll et al. (1980) propuseram que os inibidores de protease são anticarcinogênicos, e este efeito foi verificado na incidência de câncer mamário em ratas, após indução do câncer com radiação. Ratas alimentadas com soja crua apresentaram 44% de incidência, e as alimentadas com dieta de caseína, 74%.

2.4.2. Fitohemaglutininas

Além dos inibidores de proteases, a maioria das leguminosas contém em suas sementes substâncias denominadas fitohemaglutininas ou lectinas. São substâncias que possuem em suas moléculas um centro ativo específico para combinação com carboidratos. Aglutinam eritrócitos seletivamente *in vitro*, iniciam mitose em culturas de linfócitos humanos e podem aglutinar ou inativar células de tumores (Sharon e Lis, 1972). Contribuem, pelo menos em algumas espécies, para o baixo valor nutricional e para a toxicidade de sementes cruas (Liener, 1976).

Estudo realizado por Castresana et al. (1987) mostrou que as lectinas do feijão *Ph. vulgaris* se acumulam durante o desenvolvimento da semente, atingindo o nível máximo no estágio de amadurecimento, e diminuem lentamente durante a germinação.

As fitohemaglutininas representam de 2% a 10% das proteínas dos grãos das leguminosas e sua presença durante todo o ciclo vital da planta, sugere que sua função não está limitada à de uma proteína de reserva, despertando interesse pelo conhecimento de sua função fisiológica (Figueroa, 1989). Nas leguminosas parecem estar envolvidas no processo de reconhecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio (Marx, 1977), ou atuar na defesa das plantas contra a invasão de insetos e bactérias patogênicas (Janzen et al., 1976).

Seus efeitos prejudiciais à fisiologia dos animais monogástricos são o retardo ao crescimento (Liener, 1953), a diminuição da digestibilidade e da absorção do nitrogênio (Jaffé, 1961), a diminuição da digestibilidade de carboidratos (Rea et al., 1985), a alteração na atividade das enzimas intestinais e hepáticas (Jindal et al., 1984) e a diminuição na insulina do sangue (Pusztai et al., 1986).

O mecanismo de seu efeito antinutricional, quando administradas oralmente, foi proposto por Jaffé (1973) e pode ser causado pela sua habilidade em interagir com os receptores específicos das células epiteliais da parede intestinal. Pusztai et al. (1979) mostraram que as fitohemaglutininas reagem com as

células intestinais *in vitro* e causam o rompimento das microvilosidades das células epiteliais (mucosa) do duodeno e do jejuno. Embora prejudicada, a absorção ainda pode ocorrer, provavelmente através das células não alteradas, levando a absorção anormal de substâncias potencialmente perigosas, como as próprias hemaglutininas ou toxinas de origem bacteriana.

Turner e Liener (1975) avaliaram o significado nutricional da fitohemaglutinina da soja, na alimentação de ratas, com a eliminação, por cromatografia em coluna de concanavalina A-Sepharose, de sua atividade hemaglutinante. Isto possibilitou a comparação de dietas contendo extrato livre de fitohemaglutinina, com outras contendo o extrato integral, cru ou aquecido. Observaram que a dieta isenta de fitohemaglutinina propiciou crescimento e PER, que não diferiram significativamente daqueles obtidos com o extrato integral, que as continha. Estes parâmetros foram significativamente superiores para as dietas contendo o extrato aquecido. Concluíram que a fitohemaglutinina deve exercer papel relativamente pouco importante nos efeitos antinutricionais causados pela farinha de soja crua.

Pusztai e Palmer (1977) verificaram que a toxicidade de um extrato cru de feijão comum estava associada à fitohemaglutinina, isolada em coluna de fetuina-Sepharose 4B, por cromatografia de afinidade. Com a adição de diferentes quantidades de fitohemaglutininas isoladas, em rações contendo 5% de caseína, verificaram que esta exerceu forte efeito inibitório

no crescimento de ratos. A introdução nas dietas, de proteínas isentas de fitohemaglutinina não produziu efeito tóxico, confirmando a sua importância na toxicidade do feijão.

O efeito da adição de lectinas isoladas do feijão 'Rosinha G2', a uma dieta de caseína, contendo 10% de proteína, para ratos, foi estudado por Sgarbieri (1979). Este autor observou prejuízo apreciável à digestibilidade protéica e ao crescimento dos animais, embora os efeitos não fossem tão letais quanto à ração contendo farinha integral.

Honavan et al. (1962) observaram que dietas contendo farinha de feijão comum e preto crus, provocaram 100% de mortalidade dos ratos, em um prazo médio de uma semana. O aquecimento a 120°C por 30 minutos, da farinha seca ou, a 110°C por 30 minutos, do feijão úmido, impedia a morte dos animais, mas não melhorava de forma evidente a velocidade de crescimento dos mesmos. As lectinas purificadas desses feijões, adicionadas a nível de 0,5%, produziram evidente retardamento de crescimento nos animais, sendo que a do feijão comum foi 100% letal, no prazo de 13 a 16 dias.

Durigan e Sgarbieri (1987) mostraram que o efeito tóxico das proteínas da farinha de feijão cru, está relacionado à presença de lectinas, manifestado pela interação das mesmas com as vilosidades intestinais o que levava os animais experimentais a um aproveitamento inadequado dos nutrientes da ração e até à morte, quando os efeitos deletérios eram intensos e prolongados.

Observou também, que o tratamento térmico (121°C/10 minutos) foi bastante efetivo na eliminação da toxicidade natural dos grãos e tornava suas proteínas capazes de promover crescimento de ratos Wistar.

Pusztai et al. (1975) isolaram e caracterizaram parcialmente os constituintes tóxicos de um isolado protéico de feijão comum. Mostraram que as frações albumina e globulina eram tóxicas quando adicionadas à dieta de caseína, cujo conteúdo protéico era de 5%, sendo a fração albumina mais tóxica que a globulina. Identificaram lectinas nas duas frações e concluíram que a toxicidade estava diretamente relacionada ao título hemaglutinante destas duas frações.

2.5. Inativação dos fatores antinutricionais

Os efeitos tóxicos ou antinutricionais das substâncias protéicas, presentes nos grãos de leguminosas, podem ser evitados (Liener e Kakade, 1969) e o valor nutritivo melhorado (Jaffé et al., 1955; Liener, 1976) com a correta aplicação de calor. O aumento no valor nutricional será dependente da temperatura, da duração do aquecimento, do tamanho das partículas e do conteúdo de umidade (Bushman, 1979). Vários pesquisadores recomendam que antes do cozimento, os grãos sejam submetidos ao processo de maceração (Liener, 1962; Nordstrom e Sistrunk, 1977; Durigan et al., 1978). A sua principal finalidade é uniformizar o cozimento,

tornando-o menos drástico (Cabral, 1981), além do que, muitas substâncias tóxicas podem ser eliminadas, especialmente com o descarte da água usada na maceração (Sharma e Sehgal, 1992).

Os inibidores de tripsina apresentam marcada diferença na estabilidade ao calor, em diferentes cultivares de feijão. Em alguns, esta atividade é destruída em menos de 10 minutos, com aquecimento a 120°C, enquanto que em outros ela pode ser detectada após 60 minutos de tratamento a 100°C (Sgarbieri e Whitaker, 1982).

Bressani et al. (1963), com base na determinação do PER, recomendaram a autoclavagem do feijão a 121°C por 10 a 30 minutos, observando que aquecimentos por tempos prolongados resultam em diminuição do valor nutritivo da proteína, devido a mudanças no conteúdo de aminoácidos essenciais, especialmente lisina, o qual diminui proporcionalmente com o aumento do tempo de cozimento.

Rackis (1966) mostrou que o tratamento com vapor (100°C) por 20 minutos foi muito eficiente na inativação dos inibidores da soja, quando esta continha 25% de umidade, e que esta eficiência era bastante diminuída quando a umidade era reduzida para 6%.

Gallardo et al. (1974) concluíram que os tratamentos por calor úmido eram mais efetivos na inativação dos inibidores do feijão que os por calor seco, após observarem redução de 8,8% na atividade dos mesmos, quando os grãos eram aquecidos em estufa

a 100°C, e uma inativação de 36% nos grãos macerados antes deste tratamento. Buera et al. (1984) e Sharma e Sehgal (1992) também concluíram que a inativação dos inibidores é dependente do conteúdo de umidade.

Brenes et al. (1973) autoclavaram grãos de feijão a 121°C por períodos de 0 a 180 minutos e sugeriram que a relação ótima entre o tempo e a temperatura de aquecimento deve ser conhecida para cada espécie ou cultivar, uma vez que o tratamento térmico insuficiente não produz resultados satisfatórios e que o excesso prejudica o valor nutritivo dos grãos.

O aquecimento tem se mostrado bastante eficiente para os grãos inteiros, mas com efeito reduzido ou mesmo ineficiente quando se trata da farinha ou inibidores purificados, que se apresentam bastante estáveis a este tratamento. Vários autores têm reportado a presença de inibidores ativos, após o aquecimento da farinha em água fervente por 30 minutos (Antunes e Sgarbieri, 1980; Borowska e Kozłowska, 1981, Dhurandhar e Chang, 1990).

Rayas-Duarte et al. (1992), estudando nove cultivares de feijão, mostraram que a atividade dos inibidores da tripsina apresentam estabilidade mínima nos grãos, média na farinha e máxima no extrato aquoso (albumina), quando aquecidos em água fervente por 30 minutos. O aquecimento de grãos de feijão a 190°C, por 30 segundos, resultou na inativação de cerca de 72% dos inibidores (Carvalho et al., 1977), porém a farinha, ao ser aquecida em estufa a 100°C por 30 minutos, não perde atividade,

indicando a alta estabilidade dos inibidores ao tratamento a seco da farinha. No entanto, Gallardo et al. (1974) evidenciaram que o aquecimento da farinha de feijão, em estufa, a 100°C por uma hora, se mostrou efetivo na inativação dos inibidores, o que foi atribuído ao rompimento do exosperma do grão, com aumento da superfície de contato.

A presença de substâncias que aceleram a inativação dos inibidores de tripsina foi estudada por Ellenrieder et al. (1980), em suspensões aquosas e extrato aquoso centrifugado de farinha de soja, amendoim e feijão comum. Observaram que a inativação térmica dos inibidores é dependente da concentração desses extratos e suspensões. A estabilidade térmica da atividade (após aquecimento a 96°C/15 minutos) foi aumentada quando essas suspensões e extratos eram diluídos. Componentes de alto peso molecular, separados dos extratos de soja por filtração em gel de Sephadex G-75, aceleraram a destruição térmica da atividade do inibidor purificado. Estes autores sugeriram que as substâncias removidas pela centrifugação protegeriam, parcialmente, os inibidores da inativação térmica. Tsukamoto et al. (1983) mostraram que o aquecimento a 100°C por 60 minutos do extrato de feijão 'Kintoky', destruiu 90% da atividade do inibidor de tripsina, porém o inibidor purificado se apresentou estável ao mesmo tratamento, indicando haver no extrato deste feijão fatores que inativam o inibidor durante o aquecimento. Este tratamento também causou inativação do inibidor purificado por filtração em

gel de Sephadex G-100, quando na presença de proteínas de alto peso molecular, provenientes do feijão. Sugeriram que esta inativação era causada pela interação irreversível entre o inibidor de tripsina e as proteínas coexistentes e que a extensão desta inativação seria dependente da concentração de ambos.

Whitaker e Sgarbieri (1981), trabalhando com inibidores isolados do feijão 'Rosinha G2', mostraram que estes retinham 100% de sua atividade após o aquecimento a 97°C por 15 minutos, eram estáveis na faixa de pH 2 e 12 a 25°C e não eram digeridos pela pepsina a pH 2. Observaram ainda, que em solução aquosa a pH 3,8, o tratamento térmico a 130°C durante 180 minutos, inativou cerca de 80% da atividade inicial, e em pH 7, o tratamento térmico a 130°C durante 60 minutos, levou a inativação completa.

O inibidor de tripsina do feijão 'Kintoky' se apresentou muito resistente ao calor, perdendo somente 50% de sua atividade após o aquecimento a pH 5 por 10 horas, mas foi facilmente inativado a pH 6 (Myoshi et al., 1978). Tsukamoto et al. (1983) também observaram o efeito do pH na estabilidade térmica do inibidor de tripsina purificado do feijão 'Kintoky'. O inibidor manteve cerca de 90% de sua atividade após aquecimento em tampão TRIS-HCl, 50mM a pH 6 e 7, e foi gradualmente inativado quando em pH mais alcalino. Em tampão fosfato 50mM, o inibidor de tripsina mostrou-se termo-estável em pH 5,5 e 6,5 porém quando aquecido a pH 8, apresentou perda de 95% da atividade.

A estabilidade e as propriedades físicoquímicas do inibidor de tripsina do feijão-alado (*Psophocarpus tetragonolobus*), denominado inibidor de tripsina 2, foram estudadas por Gruen et al. (1984). Observaram que este inibidor se apresentava estável na faixa de pH 3 a 11, à temperatura ambiente. Um leve decréscimo na atividade ocorreu em pH menor do que 2, porém um grande decréscimo foi observado para os valores de pH acima de 11. Este inibidor se apresentou estável ao tratamento térmico a 60°C e em temperaturas entre 60 e 90°C foi mais estável a pH 3 do que em pH 5,5 ou 8,0. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos por Chan e De Lumen (1982), onde os inibidores isolados por cromatografia de afinidade se mostraram mais estáveis ao aquecimento em condições ácidas do que em alcalinas.

Ainda que a aplicação do calor na inativação dos inibidores seja um procedimento muito usado, estudos realizados por Galeazzi e Sgarbieri (1988), em amostras de feijão 'Carioca 80' autoclavados (121°C/15 minutos), demonstraram que após a digestão enzimática *in vitro* havia uma recuperação da atividade no material digerido. Desta forma, sugeriram que com a ação do calor, os inibidores se complexam com outros componentes do grão, e se tornam inativos. Ao serem submetidos à hidrólise enzimática se apresentam novamente ativos, mostrando que a ação do calor é benéfica na inativação dos inibidores porém, em determinadas condições não os elimina completamente.

A resistência oferecida pelos inibidores, à inativação térmica, pode ser devida à composição e, provavelmente à configuração compacta dos mesmos, como consequência do elevado número de ligações dissulfídicas nas suas moléculas. A redução total dessas ligações leva a uma completa inativação. Estudo realizado por Sgarbieri (1979) revelou que a incubação, a 50°C, dos inibidores isolados do feijão 'Rosinha G2', em solução 8,0M de uréia, durante 4 horas, destruiu apenas 30% da atividade inibidora, o que revelou a pequena importância e a não essencialidade das pontes de hidrogênio na manutenção da conformação natural dos centros ativos dos inibidores. Com o uso de mercaptoetanol na concentração 0,2M, 70% da atividade inibidora foi eliminada, quando incubados por 2 horas a 37°C. A incubação por 30 minutos a 25°C, em solução 0,2M de ditioneitol, eliminou 46% da atividade dos inibidores. Porém, quando a incubação foi realizada pelo mesmo tempo a 97°C, a inativação foi completa a uma concentração de apenas 0,81mM de ditioneitol.

O efeito benéfico do calor também tem sido atribuído à sua capacidade de inativar as fitohemaglutininas ou lectinas. Jaffé et al. (1972) observaram que o aquecimento prolongado ou a autoclavagem de feijões macerados em água, permitia a destruição de sua toxicidade aguda, atribuída à sua atividade hemaglutinante.

Muelenaere (1964) mostrou que as fitohemaglutininas também são mais estáveis ao calor seco, e que após o aquecimento

da farinha de alguns cultivares de feijão a 100°C por 18 horas ainda permaneciam ativas. A eficiência do aquecimento a 121°C por 10 minutos, quando o tratamento térmico era precedido de maceração, na completa inativação das fitohemaglutininas, foi observada por Honavan et al. (1962). Bonorden e Swanson (1992) observaram que a atividade hemaglutinante do feijão 'Black turtle soup' foi destruída, com o aquecimento dos grãos a 97,8°C por 10 minutos, após maceração, enquanto que para os grãos não macerados foram necessários 20 minutos. Concluíram que a inativação térmica da fitohemaglutinina do feijão é bifásica e o mecanismo de reação de primeira ordem.

O efeito do processamento e do cozimento sobre os fatores antinutricionais do feijão-fava (*Vicia faba*) foi estudado por Sharma e Sehgal (1992) e verificaram que a maceração e a retirada da casca não eliminava as fitohemaglutininas, apesar da extração pela água de maceração. Com a autoclavagem, por 25 minutos, foram inativadas e suas concentrações foram diminuídas com a germinação das sementes.

Sgarbieri (1979) observou que ao contrário dos inibidores de tripsina, as fitohemaglutininas possuem maior resistência térmica, quando o aquecimento é feito nos grãos intactos e menor resistência quando aquecidas em solução aquosa.

As fitohemaglutininas do feijão-fava, isoladas por Chudy et al. (1991), apresentaram considerável resistência térmica e a 65°C só foram desnaturadas após 30 minutos de

aquecimento, enquanto a 70°C, a perda de atividade ocorreu após 5 minutos de aquecimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizados grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) 'IAC-Carioca 80 SH', provenientes da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP.

3.2. Obtenção das Frações Protéicas

O procedimento adotado para a obtenção das frações protéicas foi basicamente o descrito por Whitaker e Sgarbieri (1981). A farinha integral de feijão (70 mesh) foi suspensa em solução 0,5M de NaCl (1:10, p/v), com pH ajustado para 2,5 com HCl a 0,1N, e agitada continuamente por 2 horas, a temperatura ambiente.

Esta suspensão foi centrifugada a 10.300xg por 40 minutos a 4°C, obtendo-se o resíduo (descartado) e o sobrenadante (extrato bruto) como indicado na Figura 1. Após diálise contra água destilada, a 4°C, por cerca de 72 horas, obteve-se o isolado protéico, que foi centrifugado a 10.300xg por 40 minutos a 4°C, resultando em uma fração insolúvel, constituída pelas globulinas, e uma fração solúvel, formada pelas albuminas.

Paralelamente, foram realizadas extrações, conforme o procedimento descrito anteriormente, onde as frações isolado protéico, albumina e globulina foram liofilizadas e armazenadas a -20°C .

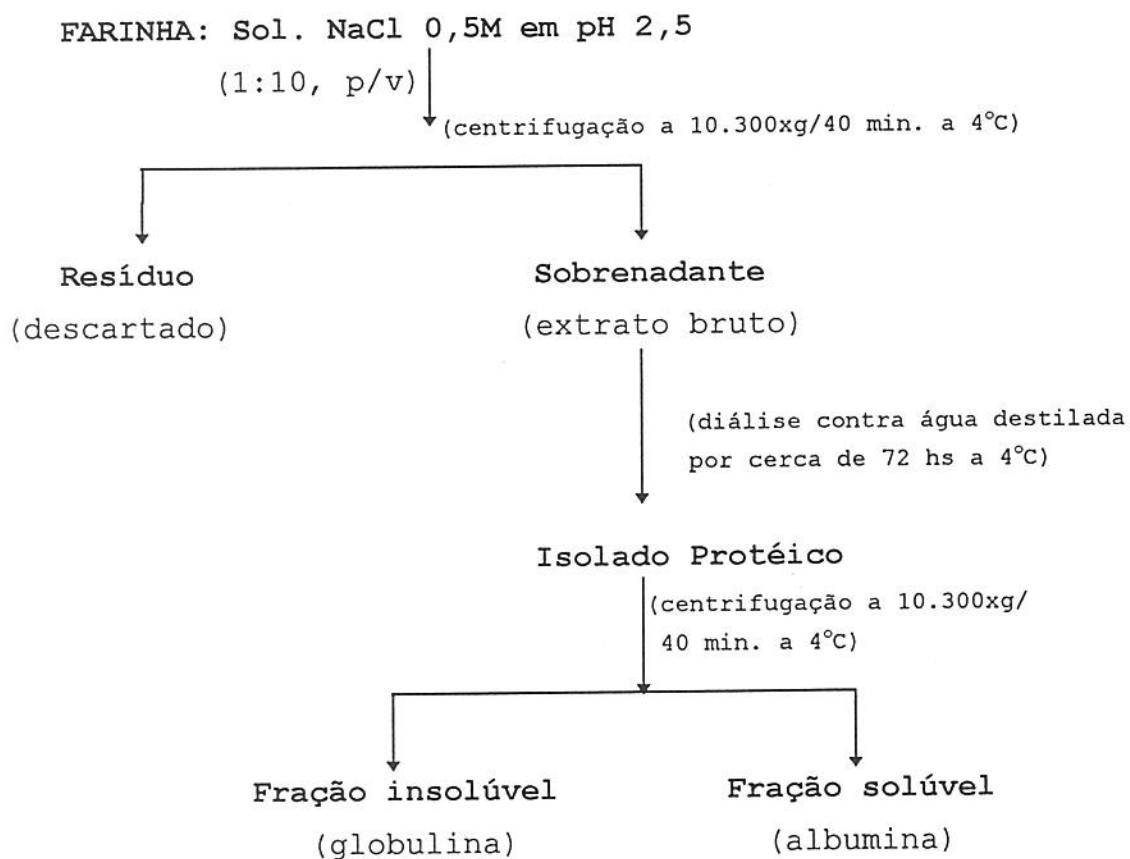


FIGURA 1 - Esquema do fracionamento utilizado para obtenção das frações protéicas.

3.3. Inativação Térmica dos Inibidores de Tripsina e das Fitohemaglutininas

Os ensaios sobre a inativação térmica dos inibidores de tripsina e das fitohemaglutininas foram realizados com os grãos inteiros e com a farinha integral, utilizando-se aquecimento em autoclave. A estabilidade térmica dos inibidores de tripsina, também foi avaliada frente ao aquecimento do grão e das frações protéicas em água fervente, assim como a influência do pH na inativação dos inibidores presentes no extrato bruto.

3.3.1. Aquecimento em autoclave

A farinha (70 mesh) e os grãos de feijão, macerados ou não em água desionizada (1:5, p/v) durante uma noite à temperatura ambiente, foram autoclavados por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, a 121°C. Após resfriamento rápido em banho de gelo, as amostras foram liofilizadas e moídas até a granulometria de 70 mesh. Até o momento de uso, o material foi armazenado a -20°C.

3.3.2. Aquecimento em água fervente

Grãos inteiros: grãos de feijão, macerados em água desionizada (1:25, p/v) durante uma noite à temperatura

ambiente, foram aquecidos a 97°C por 30 minutos, sob refluxo. Após o tratamento térmico, o material foi resfriado rapidamente em banho de gelo.

Os feijões, tratados termicamente ou não, foram homogeneizados por 4 minutos, com a água de maceração, em homogeneizador, da marca Superohm. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 10.300xg, por 40 minutos a 4°C, os resíduos descartados e os sobrenadantes estocados sob refrigeração (4°C).

Farinha integral: a farinha integral (70 mesh) foi suspensa em água desionizada na proporção 1:40 (p/v), e depois tratada termicamente em banho de água fervente (97°C) por 30 minutos. Após este aquecimento a mesma foi resfriada e centrifugada (10.300xg por 40 minutos a 4°C). Os resíduos foram descartados e os sobrenadantes armazenados (4°C).

O efeito do aquecimento em água fervente, em função do pH, foi avaliado em farinha integral suspensa (1:10, p/v) em tampão citrato 0,1M (pH 3,2), fosfato 0,1M (pH 7,6) ou borato 0,1M (pH 9,0) e agitada continuamente, por 2 horas, à temperatura ambiente. Estas suspensões foram centrifugadas a 10.300xg por 40 minutos, a 4°C e os resíduos, descartados. Os sobrenadantes foram aquecidos em água fervente por 5, 10 e 20 minutos. Após este aquecimento, foram resfriados em banho de gelo e centrifugados (10.300xg por 40 min., a 4°C). Os resíduos

foram descartados e os sobrenadantes armazenados sob refrigeração (4°C).

Frações protéicas: as frações protéicas liofilizadas (isolado protéico, albumina e globulina) foram suspensas em água desionizada (1:50, p/v), homogeneizadas por 1 minuto e aquecidas em banho de água fervente por 30 minutos. Após este tratamento, foram resfriadas em banho de gelo, centrifugadas a 10.300xg por 40 minutos, a 4°C, sendo os resíduos descartados e os sobrenadantes armazenados sob refrigeração (4°C).

3.3.3. Tratamento térmico das frações utilizadas no ensaio biológico

Procurando inativar somente as fitohemaglutininas, com manutenção da atividade dos inibidores de tripsina, as frações protéicas obtidas conforme item 3.2., foram aquecidas em banho de água fervente por 30 minutos. A fração globulina antes do aquecimento foi suspensa em água desionizada 1:10 (p/v). Após o tratamento térmico, os materiais foram resfriados em banho de gelo e liofilizados. Até o momento de uso, as frações foram armazenadas a -20°C.

3.4. Purificação dos Inibidores de Tripsina da fração Albumina

3.4.1. Aquecimento da fração albumina

A fração albumina, obtida conforme item 3.2., foi aquecida em banho de água fervente, por 15 minutos. Após resfriamento em banho de gelo e centrifugação a $10.300 \times g$ por 40 minutos, a 4°C , o resíduo foi descartado e o sobrenadante (fração não precipitada pelo aquecimento) foi liofilizado e armazenado a -20°C .

3.4.2. Cromatografia de afinidade

Os inibidores presentes na fração albumina foram purificados por cromatografia de afinidade, conforme a sequência seguinte:

a) Ativação da Sepharose com Brometo de Cianogênio

A Sepharose 4B foi ativada com brometo de cianogênio (BrCN), pelo método descrito por Kohn e Wilchker (1982).

Nesta reação, foram utilizados 50mL de Sepharose 4B, depois de sedimentada e lavada com acetona 30% e 60%, e suspensa em acetona 60% (v/v). Esta mistura foi resfriada em banho de gelo com sal (10:3), a -15°C , quando se adicionava 0,84g de BrCN

dissolvido em 7,55 mL de acetona 60%, e 6,71 mL da solução de trietilamina a 1,5M, em acetona 60%. Em seguida, esta mistura foi lavada com acetona: HCl 0,1N, na proporção 1:1 (v/v).

b) Acoplamento da tripsina à Sepharose 4B ativada

A Sepharose 4B ativada foi lavada, sucessivamente sob filtração a vácuo, com acetona 60% e 30% e água desionizada e equilibrada com o tampão de acoplamento (bicarbonato de sódio a 0,2M, pH 9,5). A solução de tripsina de pâncreas bovino, 5mg/mL, em tampão de acoplamento foi misturada ao gel e submetida a agitação orbital branda durante 12 horas, a 4°C, para promover a ligação da tripsina à matriz de Sepharose.

Terminada a reação de acoplamento, o gel foi lavado com água desionizada e suspenso em solução de glicina a 1M, na proporção 1:4 (v/v) para remover a tripsina não acoplada. A suspensão foi novamente submetida a agitação branda por 12 horas, a 4°C, filtrada, lavada com água desionizada e estocada sob a proteção de uma solução de HCl a 0,02M, sob refrigeração a 4°C.

c) Preparo da amostra e da coluna de afinidade

O procedimento adotado foi o descrito por Whitaker e Sgarbieri (1981). A tripsina-Sepharose estocada em HCl a 0,02M,

foi lavada, sucessivamente com água desionizada e duas vezes com tampão TRIS 0,02M - NaCl 0,4M, pH 8,0, em funil com placa sinterizada. A fração albumina, obtida conforme item 3.2. (contendo mais inibidor de tripsina do que a capacidade da coluna), foi previamente equilibrada em tampão TRIS 0,02M pH 8,0 contendo 0,4M NaCl e o precipitado foi removido por centrifugação (10.300 xg por 40 minutos a 4°C). O extrato foi adicionado à tripsina-Sepharose e deixado em repouso por 30 minutos, a 4°C, com agitação ocasional. As proteínas não ligadas (incluindo o excesso de inibidor) foram removidas da mistura, por filtração em funil de placa sinterizada e a Sepharose novamente lavada, por quatro vezes, com tampão TRIS 0,02M - NaCl 0,4M pH 8,0 e, por duas vezes, com água desionizada.

Este material foi suspenso em água desionizada e empacotado em coluna de vidro (2,5 x 10 cm) e os inibidores eluídos com HCl 0,02M. As frações contendo os inibidores, foram reunidas, neutralizadas com NaOH a 0,1N, dialisadas contra água desionizada, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.5. Métodos Analíticos

3.5.1. Composição química centesimal

Os teores de proteína (N x 6,25), extrato etéreo e cinzas foram obtidos de acordo com os métodos analíticos

descritos na Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984).

O conteúdo de proteína, quando necessário, também foi determinado pelo método descrito por Hartree (1972), utilizando-se como padrão a soralbumina bovina.

O teor de amido foi determinado conforme o método descrito por Kanesiro et al. (1977).

3.5.2. Composição em aminoácidos

A composição em aminoácidos foi determinada por cromatografia líquida em colunas de resina de troca catiônica e derivação pós-coluna com ninidrina, em um auto-analisador.

Para quantificação as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N, por 22 horas a 110°C e de acordo com método descrito por MOORE e STEIN (1963). Para a determinação do triptofano, as amostras foram hidrolisadas com hidróxido de lítio 4N conforme método descrito por LUCAS e SOTELO (1980).

3.5.3. Atividade dos inibidores de tripsina

A atividade dos inibidores frente à tripsina foi determinada conforme o método descrito por Kakade et al. (1969), utilizando-se o N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA)

como substrato para a tripsina. As amostras foram sempre ajustadas para que tivessem 40-60% de inibição da atividade da tripsina, em relação ao controle que não continha amostra, conforme o recomendado por Kakade et al. (1974). Uma unidade de atividade da tripsina foi definida como sendo o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 410 nm. A atividade do inibidor de tripsina representa as unidades de tripsina inibida (UTI/mg de amostra) e a atividade específica, UTI/mg de proteína.

3.5.4. Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada pelo método descrito por Junqueira e Sgarbieri (1981), a partir da observação da aglutinação de hemáceas tripsinizadas de coelho, a 4%, quando em presença da fitohemaglutinina. O título hemaglutinante representa o inverso da maior diluição capaz de promover aglutinação das hemáceas. A atividade hemaglutinante (AH) representa o título hemaglutinante/mg de amostra e a atividade hemaglutinante específica, o título hemaglutinante/mg de proteína.

3.5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A fração albumina não precipitada pelo aquecimento e os inibidores de tripsina purificados por cromatografia de

afinidade foram analisados quanto ao comportamento eletroforético em gel de poliacrilamida a 12%, utilizando-se o método de Davis (1964). Empregou-se o sistema de tampão contínuo para os eletrodos, contendo TRIS 0,005M e glicina 0,038M, pH 8,8. A eletroforese foi conduzida em um sistema de placas (10cm x 8cm) para mini géis.

Para detecção das bandas, os géis foram corados com solução, contendo 0,1% de Coomassie Blue R-250 em água/metanol/ácido acético glacial (5:5:2), e descorados com solução metanol 5%/ácido acético 7,5% (Hames, 1990).

3.5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

As amostras liofilizadas dos inibidores de tripsina obtidos por cromatografia de afinidade, da albumina não precipitada pelo aquecimento e das frações protéicas tratadas e não tratadas termicamente foram suspensas em água desionizada. A preparação foi sonicada por 15 minutos e centrifugadas (5000 xg por 5 minutos). Os sobrenadantes obtidos que continham as proteínas solúveis foram diluídos (volume a volume), em tampão de amostra constituído por TRIS-HCl (0,063M, pH 6,8) e glicerol (0,68M), β -mercaptoetanol (0,71M), SDS (dodecilsulfato de sódio, 4%) e azul de bromofenol (0,002M). Após fervura por 5 minutos, 15 μ L de cada amostra, contendo de 5 a 10 μ g de proteína, foram

submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando-se gel concentrador a 5% e gel de separação a 13% de acrilamida.

A eletroforese foi desenvolvida em um sistema de placa (10cm x 8cm) para mini géis, mantendo-se a corrente constante (20mA) até o final da corrida. Os demais critérios adotados estão descritos em Laemmli (1970).

A mistura de proteínas padrão usada continha: soralbumina bovina (PM 66.000), ovalbumina (PM 45.000), desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (PM 36.000), anidrase carbônica (PM 29.000), tripsinogênio de pâncreas bovino (PM 24.000), inibidor de tripsina da soja (PM 20.100) e α -lactalbumina (PM 14.000).

A detecção das bandas protéicas foi efetuada através da coloração dos géis por nitrato de prata, utilizando-se a técnica descrita por Morrissey (1981). Após a eletroforese, os géis, permaneceram por uma hora na solução fixadora em metanol 50%/ácido acético 10%. Após duas lavagens sucessivas, por 15 minutos, com água desionizada, os géis foram submetidos a oxidação em solução contendo 80 μ L de DTT (ditiotreitól) em 50mL de água desionizada, durante 15 minutos, e, em seguida, tratados com 50mL de nitrato de prata a 0,1%. A revelação das bandas ocorreu através de cinco lavagens sucessivas, por 20 segundos, com solução de bicarbonato de sódio a 3M. Nas três últimas lavagens, foram acrescentados 50 μ L de formaldeído a 37% à solução de bicarbonato de sódio. Após o aparecimento das bandas, a ação

do revelador foi interrompida pela adição de 12 mL de ácido cítrico a 1M. Os géis foram então imersos em água desionizada e documentados fotograficamente.

Todas as etapas do processo de coloração foram realizadas sob agitação suave e na ausência de luz.

3.5.7. Determinação do peso molecular (PM)

O peso molecular das proteínas foi determinado, através da mobilidade relativa (R_f) das bandas, detectada pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, indicada pelo azul de bromofenol. O R_f foi calculado para as proteínas padrão, para as proteínas das frações em estudo e para os inibidores de tripsina. Através da relação entre os coeficientes de mobilidade relativa e os logaritmos dos pesos moleculares dos polipeptídios padrões, estimou-se a equação de regressão referente aos pesos moleculares das proteínas.

3.5.8. Efeito da concentração do inibidor na inibição da atividade da tripsina e da α -quimotripsina

A ação dos inibidores sobre a tripsina e a α -quimotripsina foi determinada através da atividade enzimática residual, após incubação das mesmas com concentrações crescentes

dos inibidores. Os inibidores purificados por cromatografia de afinidade em concentrações compreendidas entre 0,2 a 20 μ g/mL e a fração albumina não precipitada pelo aquecimento em concentrações compreendidas entre 0,4 a 40 μ g/mL, foram dissolvidos em tampão TRIS-HCl 0,02M pH 8,2 contendo 0,02M de CaCl₂, ou em tampão TRIS-HCl 0,05M pH 7,6 contendo 0,02M de CaCl₂, para os testes com a tripsina (16 μ g/mL) e a α -quimotripsina (14 μ g/mL), respectivamente, conforme procedimentos descritos por Erlanger et al. (1961, 1966). Após 10 minutos de incubação, as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição dos respectivos substratos ao meio de reação. O substrato utilizado para a tripsina foi o N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), e para a α -quimotripsina, o N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GPNA).

As atividades da tripsina e α -quimotripsina foram determinadas espectrofotometricamente, medindo-se a absorbância a 410 nm do produto de reação, após o período de incubação. Uma unidade de atividade para tripsina ou quimotripsina foi definida como sendo o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 410 nm nas condições padrão do teste.

3.6. Avaliação dos Efeitos Antinutricionais dos Inibidores

O ensaio foi realizado para avaliar os efeitos antinutricionais dos inibidores de tripsina e fitohemaglutininas presentes nas frações protéicas (isolado protéico, albumina e globulina) não tratadas; dos inibidores presentes nas frações tratadas termicamente (97°C/30 minutos) e da adição dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade à dieta contendo globulina tratada termicamente, utilizando-se a caseína como proteína padrão.

3.6.1. Preparo das dietas

A composição centesimal das dietas e o procedimento geral dos ensaios biológicos foram realizados seguindo-se as especificações da Association of Official Analytical Chemists, (AOAC, 1975). A concentração de proteína usada nas dietas foi sempre de 10%, sendo que, para as frações tratadas e não tratadas termicamente, a caseína forneceu 50% e 60% da proteína total, respectivamente. Em uma dieta formulada com a fração globulina tratada termicamente, adicionou-se o inibidor de tripsina purificado por cromatografia de afinidade, para se obter 50% da atividade total dos inibidores fornecida pela fração albumina, o que representou 0,1% da dieta. Dietas aprotéicas sempre foram utilizadas como referência. O óleo

vegetal utilizado foi o de soja, e a fração carboidrato, que completa a dieta a 100%, foi fornecida pela mistura de 25% de sacarose e 75% de amido de milho. As formulações das dietas são apresentadas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico.

Componentes	Dieta Aprotéica (%)	Dieta Protéica (%)
Proteína ⁽¹⁾	0,0	10,0
DL-metionina ⁽²⁾	0,0	2,0
L-cisteína ⁽²⁾	0,0	2,0
Óleo vegetal	8,0	8,0
Mistura salina ⁽³⁾	3,5	3,5
Mist. vitamínica ⁽⁴⁾	1,0	1,0
Celulose	2,0	2,0
Carboidrato q.s.p.	100,0	100,0

(1)- o conteúdo protéico da dieta (10%) era fornecido pela caseína (6%) e pelas frações protéicas não tratadas (4%) ou pela caseína (5%) e pelas frações protéicas tratadas termicamente (5%).

(2)- porcentagem da proteína da dieta.

(3)- preparada conforme BIERI et al. (1977)

(4)- preparada conforme a REEVES et al. (1993).

3.6.2. Condições dos ensaios biológicos

Para cada dieta experimental foram utilizados 7 ratos machos da linhagem Wistar, pesando em média $52,25g \pm 0,39g$, os

quais foram mantidos individualmente, em gaiolas metabólicas que permitiram a avaliação do nitrogênio ingerido, fecal e urinário, assim como a variação de peso.

Os ratos, após serem submetidos a jejum durante 16 horas com água à vontade, recebiam as dietas experimentais, nas quais permaneciam por 8 dias, sendo três de adaptação. Nos outros cinco dias eram coletadas urina e fezes de todos os animais, e medida a ração consumida e o ganho em peso.

Durante o período experimental, os animais receberam alimentação e água à vontade. A temperatura ambiente foi mantida a 22°C e o ciclo noite-dia de 12 horas, controlado automaticamente.

3.6.3. Eficiência alimentar (EA) e efeito tóxico da proteína (EP)

A eficiência alimentar (EA) das dietas foi calculada, conforme Baker (1986), e o efeito tóxico e/ou antinutricional da proteína das dietas (EP), de acordo com Durigan (1985), com base nas relações:

EA= ganho de peso/consumo de dieta

EP= perda de peso/consumo de proteína

3.6.4. Balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade verdadeira (DV), valor biológico (VB) e quociente de utilização líquida da proteína (NPU).

Os índices relativos ao valor protéico das rações foram calculados, considerando-se o nitrogênio endógeno excretado na urina e nas fezes, determinados a partir do grupo que recebeu dieta aprotéica.

O balanço de nitrogênio (BN) foi calculado conforme o descrito por Mitchell (1923/1924); a digestibilidade verdadeira (DV), segundo Liener e Thompson (1980); o valor biológico (VB), de acordo com Mitchell (1923/1924); e o quociente de utilização líquida da proteína (NPU), conforme Miller e Bender (1955), com base nas relações:

$$BN = NI - [(NF - NFe) + (NU - NUs)]$$

$$DV = \frac{NI - (NF - NFe)}{NI} \cdot 100$$

$$VB = \frac{NI - [(NF - NFe) + (NU - NUs)]}{NI - (NF - NFe)} \cdot 100$$

$$NPU = \frac{NI - [(NF - NFe) + (NU - NUs)]}{NI} \cdot 100$$

onde:

NI= nitrogênio ingerido

NF= nitrogênio fecal

NFe= nitrogênio fecal endógeno

NU= nitrogênio urinário

NUe= nitrogênio urinário endógeno

3.6.5. Experimento pareado

Este experimento foi conduzido, utilizando-se a dieta de referência (caseína) contra a dieta teste (fração albumina não tratada) e preparada conforme o item 3.6.1. seguindo-se basicamente as recomendações de Glick e Joslyn (1970). Este ensaio consistiu em se fornecer a um grupo de ratos, mantidos em dieta referência (caseína), a mesma quantidade de alimento ingerida por outro grupo, considerado como seu par e mantido em dieta teste. Os grupos de ratos eram formados por sete animais machos, da linhagem Wistar com peso médio inicial de $60,36 \pm 6,45g$, mantidos em gaiolas individuais, recebendo água à vontade. A duração do experimento variou de 4 a 9 dias, dependendo da mortalidade dos ratos, e o peso dos animais foi registrado diariamente.

3.7. Tratamento Estatístico

As análises estatísticas foram realizadas, empregando-se o programa ESTAT, desenvolvido pelo Pólo Computacional da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal.

O delineamento experimental do ensaio biológico foi o de blocos casualizados e as médias dos resultados obtidos foram submetidas à análise de variância e, quando diferentes pelo teste F, comparadas entre si pelo teste de Tukey, utilizando-se o nível 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Composição Centesimal da Farinha Integral

A composição centesimal da farinha integral dos grãos de feijão 'IAC-Carioca 80 SH' está apresentada no Quadro 2.

Os componentes não determinados (END) referem-se a matéria orgânica não nitrogenada constituída, principalmente, por fibras, açúcares solúveis, oligossacarídeos e pentosanas.

QUADRO 2 - Composição centesimal da farinha integral de feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.

Componentes	g/100g ⁽¹⁾
Proteína	24,28 ± 0,34
Extrato etéreo	1,44 ± 0,03
Cinzas	3,44 ± 0,05
Carboidratos (amido)	41,47 ⁽²⁾ ± 0,53
END ⁽³⁾	29,37 ± 0,42

(1)- valores expressos com base na matéria seca e representam a média ± desvios padrões de três determinações.

(2)- valores expressos em % de amido.

(3)- END- extrativo não determinado, obtido por diferença.

4.2. Fracionamento da Farinha

4.2.1. Rendimento das frações protéicas e conteúdo em carboidrato

Os resultados do fracionamento da farinha integral dos grãos de feijão e o conteúdo em carboidratos (% de amido), estão apresentados no Quadro 3, onde os valores representam a média de três extrações quantitativas, a partir de 20g de farinha.

A extratibilidade das proteínas da farinha de feijão, em solução de NaCl a 0,5M pH 2,5, foi de 43%. A diálise do extrato bruto eliminou cerca de 24% do nitrogênio total extraído. A proporção globulina/albumina foi de 2,4, representando as albuminas cerca de 29% e as globulinas 71% do nitrogênio recuperado após a diálise.

As quantidades de isolado protéico e de resíduo insolúvel obtidas após o fracionamento, representaram 16,5g \pm 0,5g de farinha recuperada, ou seja, 82% da quantidade inicial.

Após a extração das proteínas (NaCl 0,5M em pH 2,5) e o fracionamento por diálise, observou-se que 45% do conteúdo

QUADRO 3 - Valores médios e os desvios padrão relativos à quantidade de cada fração (g), à quantidade de proteína extraída (g), ao conteúdo de proteína (%), e ao conteúdo de carboidrato (%) obtidos com o fracionamento da farinha integral do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.

Frações	Quantidade obtida (g)	Proteína extraída (g)	Proteína (%)	Rendimento (%)	Carboidrato(4) (%)
Extrato Bruto	4,17 ± 0,23	2,09 ± 0,05	50,11 ± 1,14	43 ⁽¹⁾	7,39 ± 0,21
Isolado Protéico	2,68 ± 0,14	1,58 ± 0,08	50,79 ± 0,03	76 ⁽²⁾	10,71 ± 0,03
Albumina	1,21 ± 0,02	0,46 ± 0,01	37,87 ± 0,11	29 ⁽³⁾	10,19 ± 0,03
Globulina	1,43 ± 0,01	1,13 ± 0,01	79,08 ± 2,06	71 ⁽³⁾	3,70 ± 0,01
Res. Insolúvel	13,81 ± 0,26	2,20 ± 0,04	15,94 ± 0,01	45 ⁽¹⁾	30,00 ± 0,12

(1)-porcentagem do conteúdo protéico total da farinha.

(2)-proteína total recuperada após diálise, porcentagem do total extraído.

(3)-proteína recuperada na fração albumina e fração globulina, porcentagem do total recuperado após diálise.

(4)- valores expressos em % de amido.

total de proteína da farinha permanecia no resíduo, provavelmente composto por prolaminas, glutelinas, albuminas e globulinas não extraídas.

Os valores obtidos (Quadro 3) para o conteúdo de carboidrato (% amido) indicam que todas as frações protéicas e o resíduo insolúvel estão associados com proporções variáveis de carboidrato. A fração albumina apresentou maior conteúdo (10,19%) de carboidrato que a fração globulina (3,70%), contribuindo desta forma para o menor rendimento protéico.

4.2.2. Atividade Específica dos Inibidores de Tripsina e Hemaglutinante, das Frações Protéicas Isoladas

Os resultados obtidos para a atividade específica dos inibidores de tripsina (UTI/mg proteína) e das fitohemaglutininas (título hemaglutinante/mg proteína) estão apresentados no Quadro 4, onde os valores representam a média de duas determinações com erro de dosagem inferior a 3%.

Observa-se que a fração albumina é a que contém a mais alta atividade inibidora sobre a tripsina, concentrando 2,3 vezes a atividade dos inibidores do isolado protéico.

As proteínas da fração globulina apresentam também atividade antitriptica (0,47 vezes em relação ao isolado

QUADRO 4 - Atividade específica dos inibidores de tripsina (UTI) e das fitohemaglutininas (AH) nas frações isoladas da farinha integral do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.

Frações	UTI ⁽¹⁾ /mg proteína	AH ⁽²⁾ (título/mg prot.)
Isolado Protéico	321	157
Albumina	728	480
Globulina	151	148
Resíduo	34	46

(1)- UTI - Unidades de tripsina inibida;

(2)- AH- Atividade hemaglutinante.

protéico). Embora estas proteínas contenham inibidores ativos, os valores obtidos podem indicar a ocorrência de contaminação, pelas proteínas da fração albumina, durante o fracionamento.

Os inibidores ativos presentes nas proteínas contidas no resíduo insolúvel, mesmo que em quantidades muito menores que nas frações protéicas, indicam a presença de globulinas e albuminas que não foram extraídas.

Com relação à atividade hemaglutinante (título hemaglutinante/mg proteína) observa-se que a fração albumina contém fitohemaglutininas mais ativas que a fração globulina.

4.3. Efeito do Aquecimento em Autoclave, na Inativação Térmica dos Inibidores de Tripsina e das Fitoemaglutininas presentes no Grão e Farinha

O efeito da autoclavagem, a 121°C por intervalos de 5 minutos num período de 0 a 30 minutos, dos grãos e da farinha integral do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', macerados e não macerados, medida pela atividade dos inibidores de tripsina, estão apresentados no Quadro 5 e Figura 2.

Observou-se a maior inativação com os maiores tempos de aquecimento, tanto para o grão (85% e 89% para os grãos não macerados e macerados, respectivamente) quanto para a farinha (73% e 83% para farinha não macerada e macerada, respectivamente). A inativação foi sempre maior, para qualquer tempo considerado, quando os grãos ou a farinha foram previamente macerados, indicando a influência da umidade na inativação térmica.

Na Figura 2 pode-se observar também, a maior estabilidade térmica dos inibidores na farinha macerada aos 5 e 10 minutos de aquecimento, em relação aos grãos macerados. Os inibidores apresentaram-se mais estáveis a este tratamento, quando a farinha não macerada foi aquecida, enquanto que as maiores porcentagens de inativação foram obtidas com o aquecimento do grão macerado.

QUADRO 5 - Efeito do tratamento térmico em autoclave (121°C) sobre a inativação dos inibidores de tripsina dos grãos e da farinha do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', macerados e não macerados⁽¹⁾.

Condições	Tempo de aquecimento (min.)						
	0	5	10	15	20	25	30
Grãos não macerados	15,50	4,80	4,65	4,50	4,03	3,10	2,30
Grãos macerados	15,70	4,08	3,61	3,45	2,98	2,20	1,73
Farinha não macerada	14,67	7,34	6,31	5,43	4,99	4,69	3,96
Farinha macerada	14,79	6,66	5,32	4,44	4,14	3,25	2,51

(1)- valores expressos em UTI/mg amostra, e representam a média de duas determinações, com erro de dosagem inferior a 3%.

Os valores obtidos para a inativação térmica das fitohemaglutininas (título hemaglutinante/mg amostra) dos grãos e da farinha integral, macerados e não macerados, quando foram aquecidos em autoclave (121°C) por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, estão apresentados no Quadro 6 e Figura 3.

As fitohemaglutininas apresentaram-se menos resistentes à inativação do que os inibidores de tripsina, pois a partir de 15 minutos de aquecimento acima de 90% estavam inativadas, em todos os tratamentos. Quando as amostras não foram maceradas, as fitohemaglutininas apresentaram-se mais estáveis nos grãos do

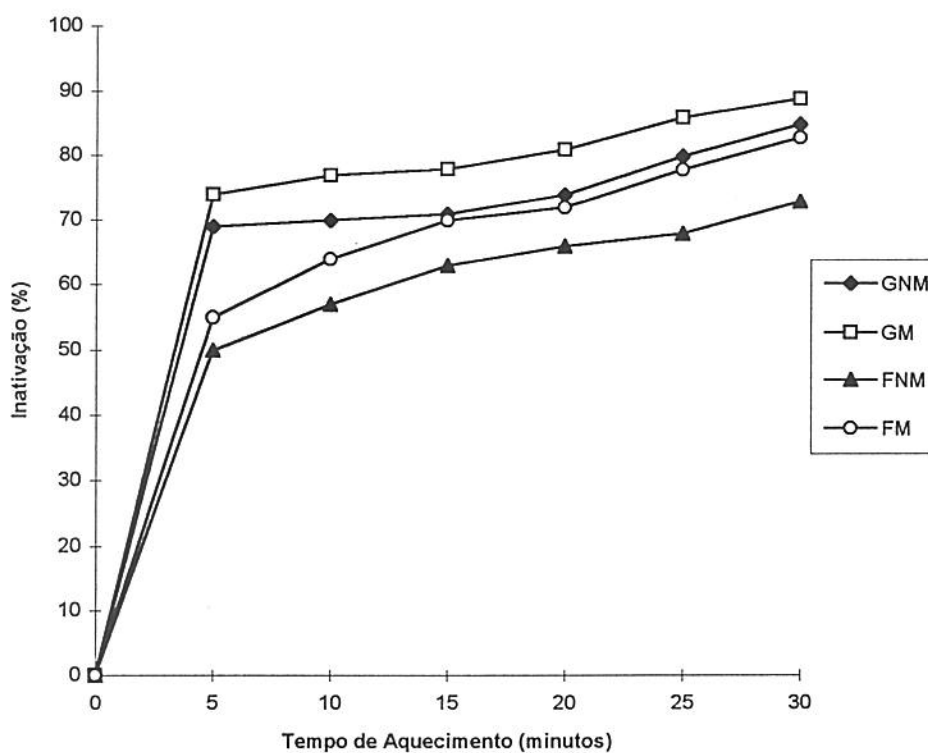


FIGURA 2- Porcentagens de inativação térmica dos inibidores de tripsina (UTI/mg amostra) dos grãos macerados (GM) e não macerados (GNM) e da farinha macerada (FM) e não macerada (FNM), do feijão 'IAC - Carioca 80 SH', autoclavados a 121°C, pelo período de até 30 minutos.

QUADRO 6 - Efeito do tratamento térmico em autoclave (121°C) sobre a inativação das fitohemaglutininas dos grãos e farinha do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', macerados e não macerados⁽¹⁾.

Condições	Tempo de aquecimento (min.)						
	0	5	10	15	20	25	30
Grãos não macerados	819	410	102	51	26	26	6
Grãos macerados	205	6	6	0	0	0	0
Farinha não macerada	819	205	102	51	26	13	6
Farinha macerada	102	51	6	0	0	0	0

(1)- valores expressos em título hemaglutinante/mg amostra, e representam a média de duas determinações, com erro de dosagem inferior a 3%.

que na farinha durante os primeiros 5 minutos de aquecimento, mas quando maceradas, 97% das fitohemaglutininas puderam ser inativadas com o aquecimento dos grãos, enquanto que 50% delas permaneciam ativas na farinha.

O aquecimento dos grãos em autoclave (121°C), após maceração, apresentou-se efetivo para a inativação dos fatores antinutricionais analisados.

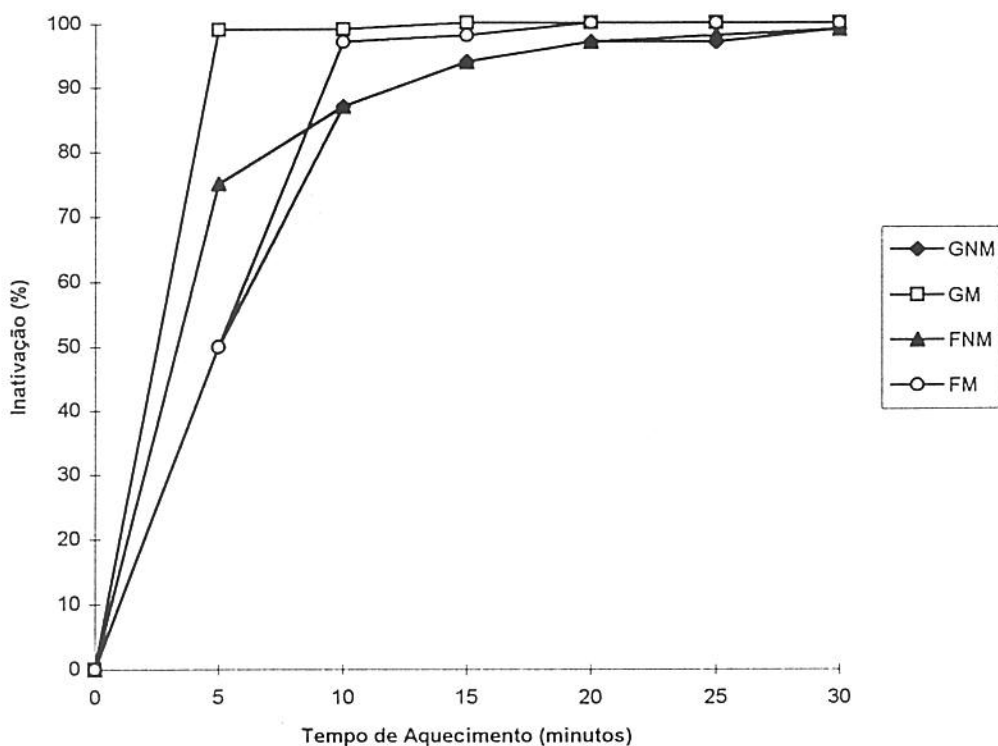


FIGURA 3- Porcentagens de inativação térmica da atividade hemaglutinante (título hemaglutinante/mg amostra) dos grãos macerados (GM) e não macerados (GNM), e da farinha macerada (FM) e não macerada (FNM) do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', autoclavados a 121°C, pelo período de até 30 minutos.

4.4. Efeito do Aquecimento em Água Fervente, na Inativação Térmica dos Inibidores de Tripsina e das Fitohemaglutininas presentes no Grão, Farinha e Frações Protéicas Isoladas.

O Quadro 7 apresenta as atividades inibidoras da tripsina (UTI/mg amostra) das amostras não tratadas e das tratadas por 30 minutos em água fervente.

Pode-se observar que a porcentagem de retenção de atividade variou com a forma em que a amostra foi submetida ao tratamento térmico. Assim, o aquecimento dos grãos por 30 minutos foi o que apresentou a maior efetividade na inativação, uma vez que retiveram apenas 13% da atividade inicial do grão.

Quando a farinha foi dispersa em água (1:40 p/v) e esta suspensão aquecida (30 minutos), os inibidores apresentaram-se mais estáveis ao calor do que nos grãos (78% de atividade residual).

Os inibidores apresentaram-se ainda mais estáveis ao tratamento térmico quando as suspensões aquosas das frações, isolado protéico, albumina e globulina foram aquecidas. As porcentagens de atividade residual foram, respectivamente 99%, 99% e 96% das atividades originais.

O tratamento térmico do isolado protéico, das albuminas e das globulinas, em água fervente por 30 minutos, foi suficiente para inativar todo o poder hemaglutinante destas

QUADRO 7 - Efeito do aquecimento em água fervente (30 minutos) na inativação dos inibidores de tripsina do grão, farinha e frações protéicas isoladas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' ⁽¹⁾.

Amostra	Crua	Aquecida	Residual %
Grãos	21,07	2,74	13
Farinha	20,11	15,69	78
Isolado protéico	36,49	36,12	99
Albumina	92,49	91,57	99
Globulina	17,57	16,87	96

(1)- valores expressos em UTI/mg amostra e representam a média de duas determinações, com erro inferior a 3%.

frações. Este procedimento foi o adotado para o tratamento térmico das frações protéicas utilizadas nos ensaios biológicos, quando se necessitou de material com inibidores ativos e isentos de atividade hemaglutinante.

4.5. Inativação Térmica dos Inibidores de Tripsina em Função do pH

Os inibidores foram extraídos da farinha integral em pH 3,2 (tampão citrato 0,1M), pH 7,6 (tampão fosfato 0,1M) e pH 9,0 (tampão borato 0,1M) e o aquecimento destes extratos em água

fervente (97°C) por 5, 10 e 20 minutos, mostrou a influencia do pH na inativação térmica dos mesmos. O Quadro 8 e a Figura 4 mostram estes efeitos.

Quando o aquecimento ocorreu em pH mais ácido observou-se menor porcentagem de inativação, a qual foi maior quanto mais alcalino o pH, em relação à atividade dos inibidores não aquecidos. O aquecimento por 20 minutos propiciou 32%, 45% e 70% de inativação, respectivamente, para os tratamentos em pH 3,2, pH 7,6 e pH 9,0.

QUADRO 8 - Influência do pH de extração na inativação térmica dos inibidores de tripsina, quando aquecidos a 97°C⁽¹⁾.

Tratamento (pH)	Tempo de aquecimento (min.)			
	0	5	10	20
3,2 (tampão citrato 0,1M)	15,56	11,67	11,20	10,58
7,6 (tampão fosfato 0,1M)	15,25	11,89	8,08	8,34
9,0 (tampão borato 0,1M)	14,18	9,93	7,34	4,25

(1)- valores expressos em UTI/mg amostra, e representam a média de duas determinações, com erro inferior a 3%.

4.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS, das Frações Protéicas Tratadas e Não Tratadas Termicamente

Os perfis eletroforéticos das frações protéicas não tratadas e tratadas a 97°C por 30 minutos são apresentados na Figura 5. O perfil 1 equivale às proteínas padrão, os de números 2, 4 e 6 são referentes, respectivamente, às frações isolado protéico, albumina e globulina não tratadas, e os perfis 3, 5 e 7 referem-se a estas frações protéicas quando tratadas termicamente.

Pela análise dos perfis eletroforéticos observa-se que a fração albumina não tratada (Perfil 4) se apresentou mais complexa que as demais, compondo-se de onze bandas protéicas com peso molecular entre 43.900 a 14.700. As bandas protéicas mais concentradas desta fração e do isolado protéico não tratado apresentaram pesos moleculares entre 35.700 e 30.600.

As proteínas com pesos moleculares entre 19.300 e 14.700 estiveram presentes nos perfis eletroforéticos das frações não tratadas. Estas bandas referem-se aos inibidores de tripsina, que permaneceram ativos nas frações protéicas após o tratamento térmico (Quadro 7), apesar da proteína com menor peso molecular não ter sido detectada nas frações aquecidas.

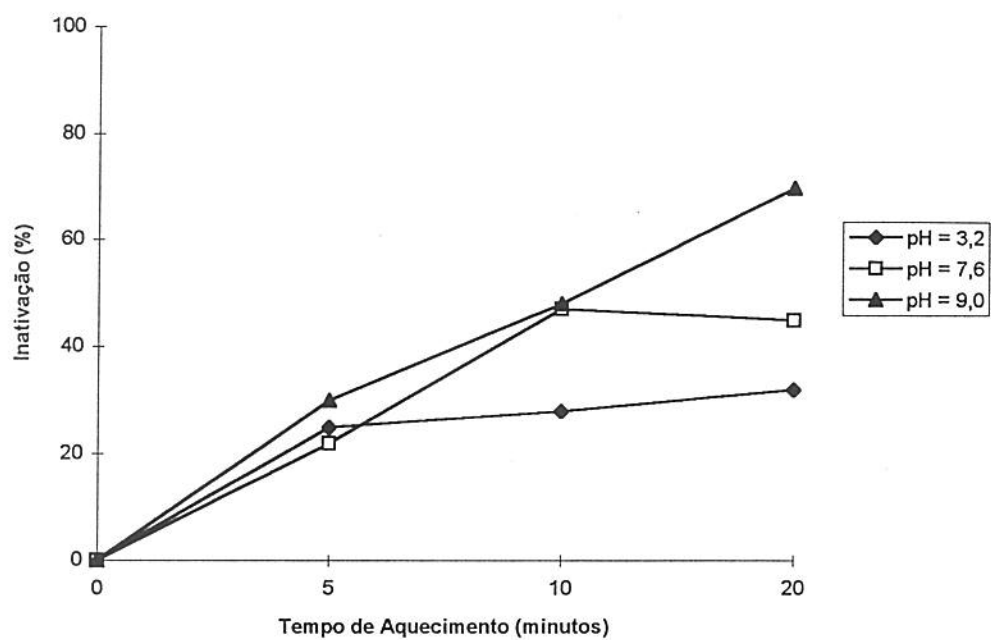


FIGURA 4 - Porcentagens de inativação térmica dos inibidores de tripsina (UTI/mg amostra) extraídos em função do pH e aquecidos a 97°C, pelo período de até 20 minutos.

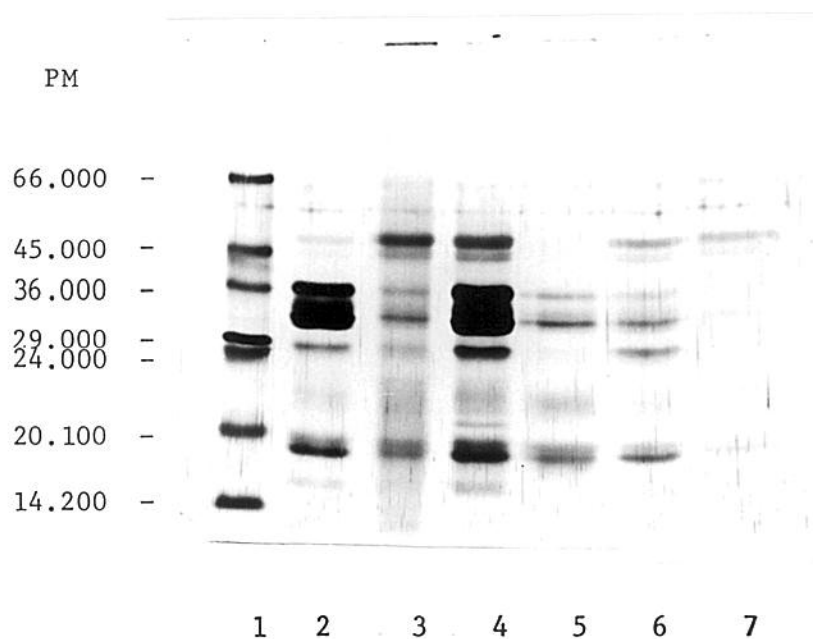


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações protéicas não tratadas e tratadas, a 97°C por 30 minutos.

Perfil 1- proteínas padrão; perfil 2- isolado protéico; perfil 3- isolado protéico tratado; perfil 4- albumina; perfil 5- albumina tratada; perfil 6- globulina; perfil 7- globulina tratada.

4.7. Composição em Aminoácidos das Frações Protéicas Tratadas e não Tratadas

O Quadro 9 apresenta a composição em aminoácidos das frações extraídas da farinha integral do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', após terem sido tratadas termicamente (97°C, por 30 minutos) e das não tratadas.

A globulina contém os maiores conteúdos de leucina, tirosina e dos aminoácidos essenciais, exceção feita ao triptofano e treonina, que se apresentaram como os mais limitantes. Dentre todas as frações, a globulina possui menos ácido aspártico, prolina e alanina.

Na fração albumina encontram-se as maiores concentrações de treonina, triptofano e $\frac{1}{2}$ cistina e menor conteúdo de histidina. O isolado protéico continha somente teor mais elevado de ácido aspártico em relação às outras frações, e os menores teores de metionina, fenilalanina e arginina.

O aquecimento levou a uma redução nos teores de quase todos os aminoácidos.

QUADRO 9 - Composição em aminoácidos das frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' após terem sido tratadas a 97°C por 30 minutos e das não tratadas⁽¹⁾.

	Isolado Protéico		Albumina		Globulina	
	não aquec.	aquecido	não aquec.	aquecida	não aquecida	aquecida
Ác. aspártico	13,50	11,41	12,94	9,59	11,51	8,39
Treonina	5,12	5,01	7,16	7,12	4,51	4,13
Serina	6,19	5,13	7,44	6,43	6,43	5,89
Ác. glutâmico	15,55	11,69	16,29	10,04	16,28	11,35
Prolina	4,66	3,42	5,38	3,71	3,13	2,60
Glicina	4,07	3,96	4,04	3,70	4,00	3,38
Alanina	4,13	4,07	4,82	4,33	3,78	3,52
½ Cistina	0,96	0,89	1,84	1,71	0,91	0,88
Valina	5,26	4,62	5,28	5,12	5,84	5,01
Metionina	1,19	1,07	1,28	1,11	1,28	1,38
Isoleucina	4,71	4,84	5,80	4,91	6,42	5,48
Leucina	9,03	7,77	9,14	8,09	11,57	8,06
Tirosina	3,30	3,30	4,14	4,28	5,12	4,44
Fenilalanina	6,06	6,26	6,46	6,51	8,90	7,14
Lisina	6,48	6,29	6,97	6,10	8,39	7,90
Histidina	4,87	4,47	2,96	2,73	3,95	3,93
Arginina	4,82	4,23	5,48	4,36	6,96	6,99
Triptofano	0,92	1,05	1,32	2,22	0,63	0,39

(1) - valores expressos em g/100g proteína.

4.8. Purificação dos Inibidores de Tripsina da Fração Albumina.

Como a fração albumina apresentava a maior atividade inibidora que era estável ao tratamento térmico, utilizou-se o aquecimento em água fervente por 15 minutos como procedimento para purificar os inibidores de tripsina desta fração.

Com o aquecimento da albumina, parte das proteínas precipitaram-se, permanecendo na fração não precipitada quase que toda a atividade inibidora, o que permitiu recuperar cerca de 92% da atividade total inicial (Quadro 10).

Os inibidores presentes na fração albumina também foram purificados por cromatografia de afinidade e os resultados estão apresentados no Quadro 10. Esta técnica permitiu que eles fossem purificados 30 vezes, com uma recuperação de 64% da atividade. A recuperação relativamente baixa desta atividade foi consequência da quantidade de extrato usada para a adsorção dos inibidores à matriz Sepharose-tripsina, a qual excedia a capacidade da coluna em 30-40%. Isto foi feito, com o propósito de prevenir possível proteólise dos inibidores e de minimizar a adsorção de outras proteínas.

QUADRO 10 - Purificação dos inibidores de tripsina da fração albumina do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.

Fração Protéica	Volume (mL)	Proteína total (mg)	UTI/mL	UTI total	UTI/mg proteína	Recuper. (%)	Purific. (nº vezes)
Albumina	160	651,0	3.583	573.280	881	100	-
Albumina não precipitada pelo aquecimento ⁽¹⁾	130	286,0	4.057	527.418	1.844	92	2,1
Inibidor eluído na coluna de afinidade	270	13,9	1.359	366.930	26.398	64	30,0

1- aquecimento a 97°C por 15 minutos.

4.9. Caracterização dos Inibidores de Tripsina da Fração Albumina.

4.9.1. Comportamento eletroforético

Os perfis eletroforéticos, em condição não desnaturante, da fração albumina não precipitada pelo aquecimento, estão apresentados na Figura 6. As bandas protéicas com Rf 0,44 e Rf 0,53 (perfis 2 e 3) referem-se aos inibidores de tripsina. A banda protéica com Rf 0,62 da fração albumina (Figura 6, perfil 1), que se apresenta com pouca intensidade, não foi detectada na fração albumina não precipitada pelo aquecimento, e proteínas com mobilidades menores permaneceram nesta fração.

Na Figura 7 estão apresentados os perfis dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade. As bandas protéicas apresentaram Rf 0,43, Rf 0,49 com a maior intensidade e Rf 0,56 indicando, assim, a existência de três inibidores de tripsina no feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.

4.9.2. Composição em aminoácidos

Os resultados da análise de aminoácidos da fração albumina não precipitada pelo aquecimento e dos inibidores

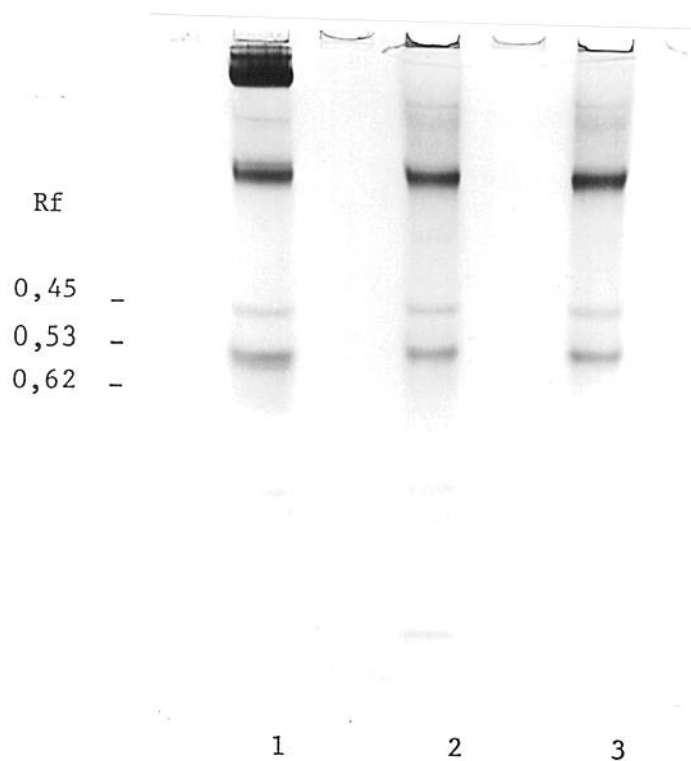


FIGURA 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração albumina (perfil 1) e da fração albumina não precipitada pelo aquecimento (perfis 2 e 3).

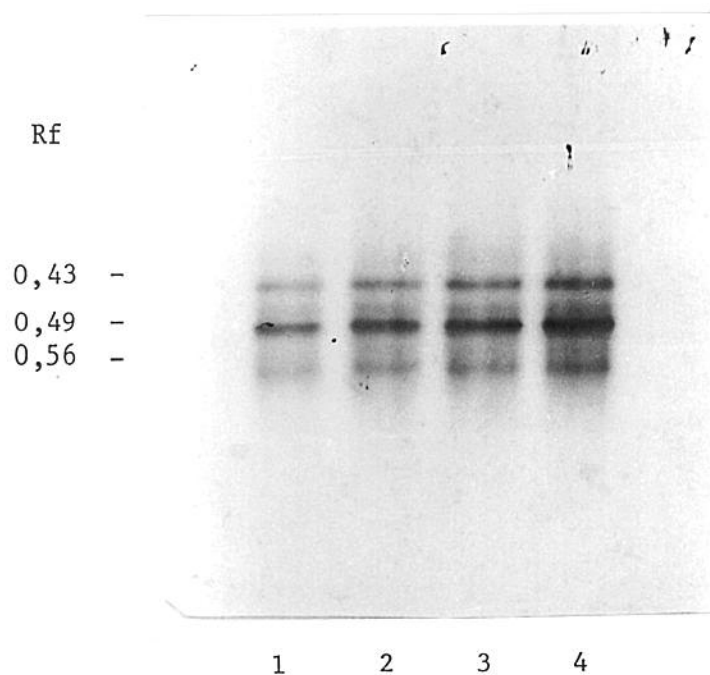


FIGURA 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade: perfil 1 (15 μ L), perfil 2 (20 μ L); perfil 3 (25 μ L) e perfil 4 (30 μ L).

purificados por cromatografia de afinidade, estão apresentados no Quadro 11.

Na composição da fração albumina não precipitada pelo aquecimento, observou-se uma predominância de treonina, prolina e lisina, além dos ácidos aspártico e glutâmico, e teores muito baixos de metionina, de $\frac{1}{2}$ cistina, de histidina e de triptofano.

Nos inibidores purificados por cromatografia de afinidade predominaram o ácido aspártico, a serina, o ácido glutâmico, a $\frac{1}{2}$ cistina e a prolina, apresentando baixos teores de triptofano, metionina e de glicina.

A composição em aminoácidos (g/100g proteína) apresenta-se similar em leucina, tirosina, lisina e triptofano, estando as diferenças mais acentuadas nos conteúdos de serina e $\frac{1}{2}$ cistina, e de ácido glutâmico e glicina, que são mais elevados, respectivamente, no inibidor purificado por cromatografia de afinidade, e na fração albumina não precipitada pelo aquecimento.

QUADRO 11 - Composição em aminoácidos da fração albumina não precipitada pelo aquecimento e dos inibidores de tripsina do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' ⁽¹⁾.

Aminoácido	Album. não precipitada pelo aquecimento	Cromatografia de afinidade
Ácido aspártico	11,29	13,23
Treonina	5,70	6,33
Serina	5,03	8,49
Ác. glutâmico	14,59	8,65
Prolina	5,88	6,98
Glicina	4,01	0,63
Alanina	4,51	2,46
½ Cistina	2,47	10,67
Valina	4,37	1,88
Metionina	2,20	1,76
Isoleucina	3,64	5,32
Leucina	4,71	4,32
Tirosina	3,48	3,73
Fenilalanina	3,79	3,11
Lisina	5,75	5,22
Histidina	1,99	4,72
Arginina	5,05	3,78
Triptofano	1,06	1,04

(1)- valores expressos em g/100g proteína.

4.9.3. Determinação do Peso Molecular

Os inibidores contidos na fração albumina não precipitada pelo aquecimento (Figura 8, perfil 3), apresentaram mobilidades eletroforéticas equivalentes aos inibidores da fração albumina, com $R_f = 0,69$, $R_f = 0,73$ e $R_f = 0,78$.

Os inibidores purificados por cromatografia de afinidade, quando submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, contendo SDS, apresentaram três bandas protéicas difusas, com $R_f = 0,69$, $R_f = 0,72$ e $R_f = 0,84$ (Figura 9, perfil 3).

Através do logaritmo dos pesos moleculares (Y) e da mobilidade relativa (X) das proteínas padrão das Figuras 8 e 9, estabeleceu-se, respectivamente, as seguintes equações de regressão $\log Y = 5,021 - 1,091X$, e $\log Y = 5,028 - 0,989X$ que permitiram estimar os pesos moleculares dos inibidores.

Os pesos moleculares assim determinados foram 18.544, 16.771 e 14.792 para os inibidores contidos na fração albumina não precipitada pelo aquecimento e 22.160, 20.700 e 15.750 para os inibidores purificados por cromatografia de afinidade.

4.9.4. Efeito da concentração do inibidor sobre a atividade da tripsina e da α -quimotripsina

As inibições da tripsina e quimotripsina pelos

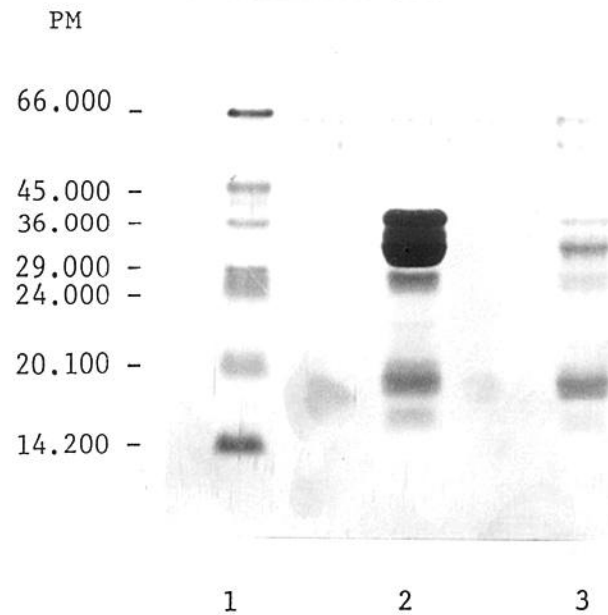


FIGURA 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. 1- proteína padrão; 2- fração albumina; 3- fração albumina não precipitada pelo aquecimento.

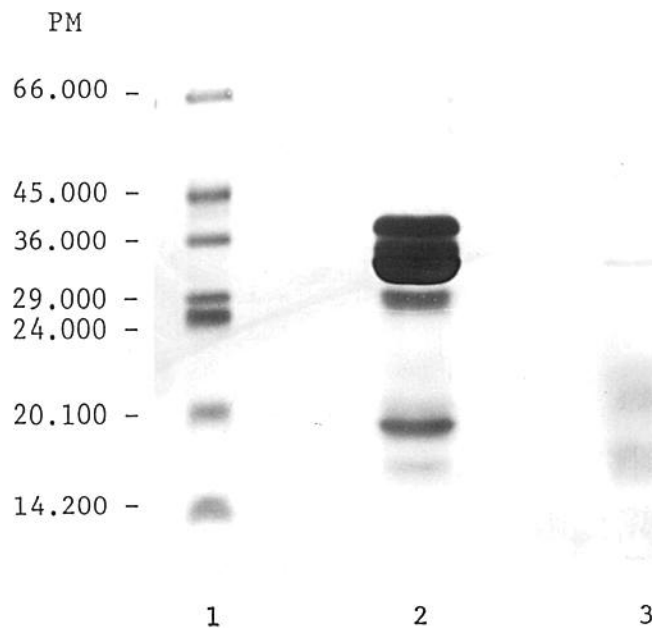


FIGURA 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. 1- proteína padrão; 2- fração albumina; 3- inibidores purificados por cromatografia de afinidade.

inibidores purificados pela cromatografia de afinidade foram lineares, onde as relações enzima:inibidor foram 1,3 e 1,4, respectivamente (Figuras 10 e 11). No caso das inibições das enzimas pelos inibidores da fração albumina não precipitada pelo aquecimento (Figuras 12 e 13), o comportamento não foi linear em função da concentração de inibidor, originando uma curva aparentemente bifásica. Na primeira fase as relações enzima:inibidor foram 1,26 para tripsina e 1,8 para quimotripsina, enquanto que na segunda fase, praticamente as enzimas não foram inibidas, onde as relações foram respectivamente 0,2 e 0,3.

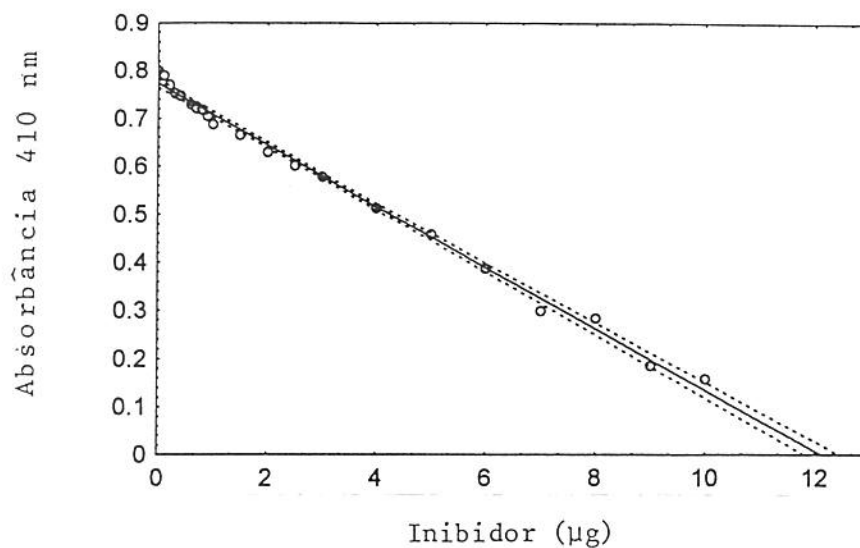


FIGURA 10 - Efeito da concentração dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade sobre a atividade da tripsina.

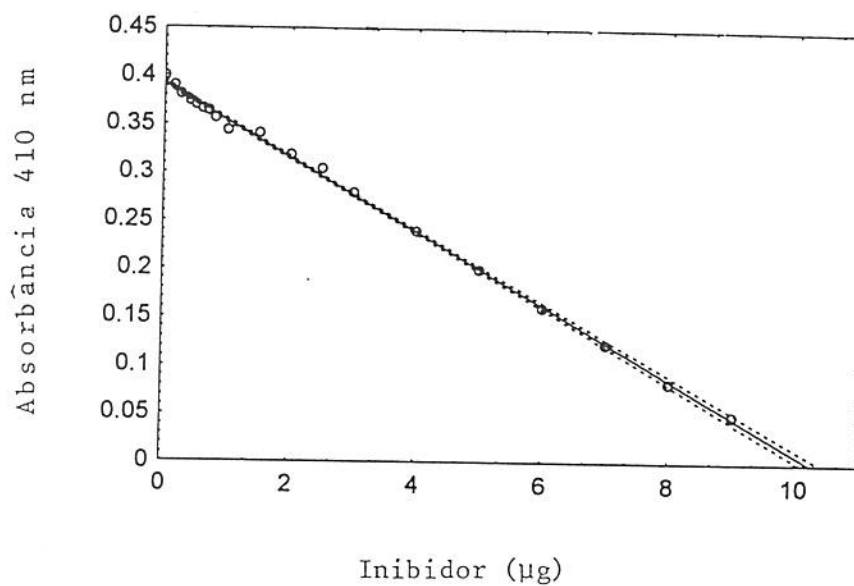


FIGURA 11 - Efeito da concentração dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade sobre a atividade da α -quimotripsina

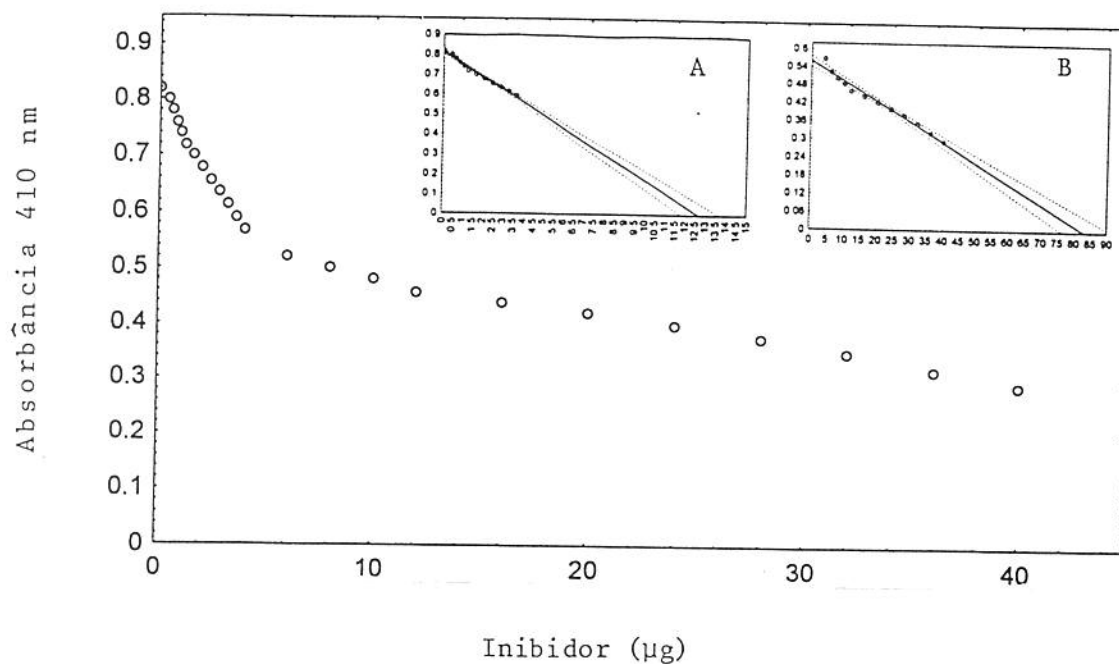


FIGURA 12 - Efeito da concentração dos inibidores da fração albumina não precipitada pelo aquecimento sobre a atividade da tripsina. Nas inserções A e B são mostradas as representações de cada fase da curva para a interação enzima inibidor.

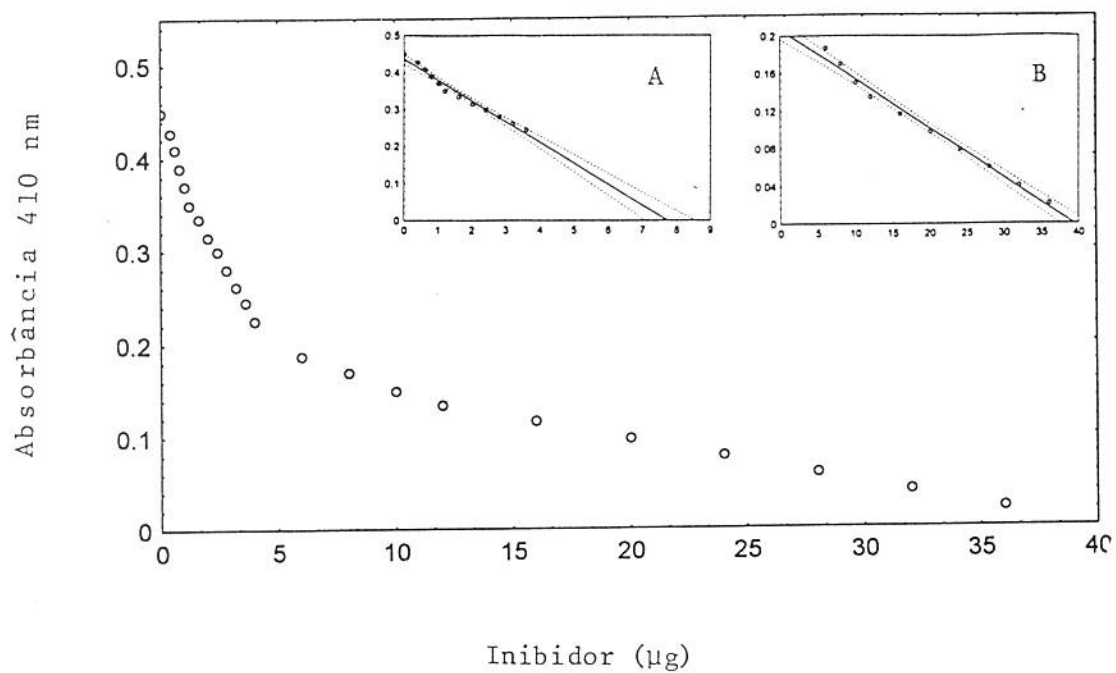


FIGURA 13 - Efeito da concentração dos inibidores da fração albumina não precipitada pelo aquecimento sobre a atividade da α -quimotripsina. Nas inserções A e B são mostradas as representações de cada fase da curva para interação enzima inibidor.

4.10. Avaliação dos Efeitos Antinutricionais dos Inibidores

A porcentagem de proteína das dietas e a atividade total dos inibidores de tripsina e das fitohemaglutininas em 100g de dieta, estão apresentados no Quadro 12.

Em todas as dietas que continham proteínas do feijão encontraram-se inibidores ativos enquanto que as frações tratadas se apresentaram isentas de atividade hemaglutinante. A atividade dos inibidores, na dieta formulada com globulina tratada adicionada de inibidor representou 46% da atividade da albumina não tratada.

Na dieta contendo a fração albumina não tratada, a atividade hemaglutinante foi a mais elevada, provocando a morte de todos os ratos a partir do terceiro dia de balanço. O período de maior sobrevivência na dieta foi de cinco dias, correspondendo a três dias de adaptação e dois dias de coleta de fezes e urina, o que levou a não consideração deste tratamento na análise dos resultados.

4.10.1. Consumo de dieta e ganho em peso

Os valores médios, com os respectivos desvios padrões referentes ao consumo de dieta e os ganhos em peso, durante o balanço, e de valores obtidos para a eficiência alimentar estão

QUADRO 12 - Quantidade de proteína (g) e atividades totais dos inibidores de tripsina e das hemaglutininas para 100g de dieta.

Dieta	Proteína na dieta (g)	UTI total ⁽³⁾ (x 10 ⁻³)	A.H. ⁽⁴⁾ (x 10 ⁻³)
Caseína	10,26	-	-
Isol. Prot. não trat. ⁽¹⁾	10,73	249,96	438,40
Isol. Prot. tratado ⁽²⁾	10,08	309,55	0,00
Albumina não tratada ⁽¹⁾	10,85	1096,01	1516,80
Albumina tratada ⁽²⁾	10,66	1012,74	0,00
Globulina não trat. ⁽¹⁾	10,24	105,42	660,48
Globulina tratada ⁽²⁾	10,10	102,16	0,0
Glob. trat. + inibidor ⁽²⁾	10,05	504,16	0,0

(1)- o conteúdo protéico da dieta (10%) era fornecido pela caseína (6%) e pelas frações protéicas não tratadas (4%).

(2)- o conteúdo protéico da dieta (10%) era fornecido pela caseína (5%) e pelas frações protéicas tratadas (5%).

(3)- unidades tripsina inibida/100g de dieta.

(4)- título hemaglutinante/100g de dieta.

apresentados no Quadro 13. Através destes resultados verifica-se que os animais que receberam dieta de caseína ou as que continham as frações protéicas tratadas (isolado protéico e globulina) consumiram mais alimento, quando comparados com os que receberam dietas com as frações não tratadas e aprotéica. O consumo de dieta com globulina não tratada foi semelhante ao que

continha isolado protéico não tratado e albumina tratada, chegando a não ser diferente da quantidade média consumida pelo ratos em dieta aprotéica.

Observa-se também que o ganho em peso dos animais alimentados com dieta contendo globulina não tratada, foi inferior aos alimentados com dieta de caseína ou das que continham frações tratadas termicamente como fontes protéicas. Os ratos alimentados com dieta aprotéica ou a que continha o isolado protéico não tratado, perderam peso.

A adição dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade à dieta de globulina tratada não alterou significativamente, o consumo e nem o ganho em peso, em relação à caseína.

Considerando-se as porcentagens de ganho em peso em relação à caseína 100%, observa-se que esta foi menor para a fração globulina não tratada.

O menor aproveitamento das dietas contendo frações protéicas não tratadas, pelos animais é mostrado pela eficiência alimentar (relação ganho em peso/consumo dieta) que foi 0,0 e 0,12 para isolado protéico e globulina, respectivamente, valores estes bem inferiores do que os obtidos para caseína e frações tratadas termicamente.

QUADRO 13 - Consumo de dieta, ganho em peso e eficiência alimentar, para ratos alimentados com dietas contendo frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', tratadas e não tratadas termicamente, ao fim do balanço de cinco dias⁽¹⁾.

Dietas ⁽²⁾	Cons. dieta no balanço (g)	Ganho em Peso (g)	Eficiência alimentar
Caseína	59,3 ± 4,4 ^a	23,4 ± 3,0 ^a (100,0) ⁽²⁾	0,39
Isol. prot. não tratado ⁽²⁾	21,5 ± 2,8 ^c	-0,2 ± 0,4 ^c -	0,00
Isol. prot. tratado ⁽³⁾	49,7 ± 5,1 ^a	18,5 ± 2,2 ^{ab} (79,0)	0,37
Albumina tratada ⁽³⁾	40,5 ± 5,1 ^b	13,0 ± 2,1 ^b (56,0)	0,32
Glob. não tratada ⁽²⁾	31,2 ± 7,5 ^{bc}	3,9 ± 3,1 ^c (21,7)	0,12
Globulina tratada ⁽³⁾	55,7 ± 7,0 ^a	20,9 ± 3,6 ^a (89,0)	0,37
Glob. trat. + inib. ⁽³⁾	56,7 ± 5,8 ^a	17,6 ± 2,2 ^{ab} (75,0)	0,31
Aprotéica	27,6 ± 2,4 ^c	-3,2 ± 0,5 ^c -	-0,12

(1)- os resultados representam as médias de 7 ratos em cada dieta.

(2)- valores apresentados em parenteses representam % de ganho em peso, em relação à caseína 100%

Obs.: Nas colunas, médias seguidas de pelo menos uma letra comum não diferem entre si (P < 0,05)

4.10.2. Balanço de nitrogênio

Os valores de nitrogênio ingerido (NI), excretado nas fezes (NF) e na urina (NU), assim como o de nitrogênio retido (NR), ao final do balanço, estão apresentados no Quadro 14.

Observa-se que os animais que receberam dietas contendo frações não tratadas apresentaram menor ingestão de nitrogênio, e a eliminação de nitrogênio fecal foi maior em relação às frações isolado protéico e albumina tratada, porém semelhantes às dietas com globulina tratada e globulina tratada + inibidor. Em todas as dietas contendo proteína de feijão, a excreção do nitrogênio fecal foi significativamente maior do que para a dieta de caseína, o que foi acompanhada por diminuição, embora não significativa, do nitrogênio urinário.

As retenções de nitrogênio pelos ratos alimentados com as frações não tratadas, foram as menores. A dieta de caseína e as que continham globulinas tratadas, adicionadas ou não de inibidores, apresentaram retenções semelhantes.

A adição dos inibidores purificados à dieta de globulina tratada não afetou a retenção de nitrogênio.

QUADRO 14 - Balanço de nitrogênio, de ratos alimentados com dietas contendo frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' tratadas e não tratada termicamente, ao fim do balanço de cinco dias⁽¹⁾.

Dietas	N ingerido (mg)			N retido (mg)		
	N ingerido (mg)	N fecal (mg)	N urinário (mg)	N ingerido (mg)	N fecal (mg)	N retido (mg)
Caseína	972,7 ± 71,8 ^a	52,0 ± 10,0 ^d	155,6 ± 60,4 ^a	789,0 ± 12,6 ^a		
Isol. prot. não tratado	370,0 ± 47,8 ^d	202,0 ± 27,7 ^a	88,7 ± 25,3 ^a	103,1 ± 50,7 ^d		
Isol. protéico tratado	800,8 ± 82,2 ^{ab}	141,1 ± 17,8 ^{bc}	87,3 ± 20,7 ^a	596,2 ± 90,4 ^{bc}		
Albumina tratada	691,2 ± 128,9 ^{bc}	117,6 ± 35,1 ^c	146,3 ± 78,7 ^a	451,2 ± 71,2 ^c		
Globulina não tratada	512,0 ± 122,6 ^{cd}	208,8 ± 47,4 ^a	100,5 ± 33,9 ^a	226,6 ± 50,1 ^d		
Globulina tratada	901,3 ± 112,6 ^{ab}	181,7 ± 16,1 ^{ab}	108,3 ± 40,2 ^a	635,1 ± 101,9 ^{ab}		
Glob. tratada + inib.	1018,4 ± 112,5 ^a	173,1 ± 28,2 ^{abc}	124,8 ± 25,2 ^a	744,4 ± 128,3 ^{ab}		
Aprotéica	-	12,9 ± 2,2 ^d	10,3 ± 2,4 ^b	-		

(1)- os resultados representam as médias de 7 ratos em cada dieta.

Obs.: Nas colunas, médias seguidas de pelo menos uma letra comum não diferem entre si (P < 0,05)

4.10.3. Digestibilidade verdadeira (DV), valor biológico (VB) e utilização líquida da proteína (NPU)

Os resultados obtidos para a digestibilidade verdadeira, valor biológico e utilização líquida da proteína estão apresentados no Quadro 15. Observam-se valores superiores para as dietas contendo as frações protéicas tratadas em relação às que continham frações protéicas não tratadas termicamente.

Com relação à digestibilidade verdadeira e utilização líquida da proteína as frações, isolado protéico e globulina não tratadas, apresentaram valores significativamente menores que as demais. Todos os valores de digestibilidade para as dietas contendo as frações protéicas foram menores do que o da dieta de caseína (96%), e apresentaram-se semelhantes para as frações aquecidas. A utilização líquida da proteína da dieta de caseína foi mais elevada, porém sem diferença significativa para as que continham frações tratadas, exceção à albumina.

O valor biológico foi significativamente menor, com o uso da fração isolado protéico não tratado (54,3%). Os inibidores de tripsina, presentes nas frações protéicas aquecidas ou quando adicionado à dieta na forma purificada, não afetaram significativamente o valor biológico da proteína.

QUADRO 15 - Digestibilidade verdadeira (DV), valor biológico (VB) e utilização líquida da proteína (NPU) em ratos alimentados com dietas contendo frações protéicas do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' tratadas e não tratadas termicamente, ao fim do balanço de cinco dias⁽¹⁾.

Dietas ⁽²⁾	DV		VB		NPU	
	%		%		%	
Caseína	96,0 ± 1,0 ^a	84,8 ± 5,2 ^a	81,4 ± 5,0 ^a			
Isol. Prot. não tratado	52,1 ± 3,8 ^d	54,3 ± 10,0 ^b	26,7 ± 11,0 ^d			
Isol. Prot. tratado	83,9 ± 2,7 ^b	88,4 ± 3,7 ^a	74,2 ± 11,9 ^{ab}			
Albumina tratada	85,7 ± 5,6 ^b	75,9 ± 9,7 ^a	65,3 ± 9,0 ^b			
Globulina não tratada	61,4 ± 4,4 ^c	72,7 ± 6,3 ^{ab}	44,5 ± 2,5 ^c			
Globulina tratada	81,1 ± 2,2 ^b	88,5 ± 5,1 ^a	70,3 ± 4,8 ^{ab}			
Glob. tratada + inib.	84,6 ± 3,2 ^b	86,4 ± 4,2 ^a	72,9 ± 5,9 ^{ab}			

(1)- os resultados representam as médias de 7 ratos em cada dieta.

Obs.: Nas colunas, médias seguidas de pelo menos uma letra comum não diferem entre si (P < 0,05)

4.11. Experimento Pareado

A toxicidade da fração albumina crua ficou evidenciada com a morte dos ratos no experimento de balanço de nitrogênio, a partir do terceiro dia de permanência na dieta. Para verificar se esta mortalidade era função da pequena ingestão do alimento (inanição) ou da toxicidade da dieta, realizou-se um experimento pareado de alimentação, no qual a dieta de caseína foi utilizada como referência. Os valores obtidos com este experimento estão apresentados no Quadro 16.

O consumo de dieta e conseqüentemente o de proteína foram semelhantes entre as dietas referência (caseína) e teste (albumina não tratada). O tempo de sobrevivência na dieta teste foi, em média, de 5,7 dias, com intervalo de tempo entre 4 a 9 dias e a perda de peso foi maior para os ratos mantidos nesta dieta.

O efeito tóxico e/ou antinutricional da fração albumina não tratada é evidenciado pela relação perda de peso/consumo proteína, que foi significativamente superior (-4,9) em relação à dieta de caseína (-2,3).

A quantidade de alimento ingerida pelos ratos mantidos em dietas de caseína, mesmo perdendo peso, não provocou a morte dos animais no período considerado. As proteínas da fração albumina, quando presentes inibidores e hemaglutininas ativas, foram tóxicas para os animais experimentais.

QUADRO 16 - Teste pareado em ratos alimentados com dieta teste (fração albumina não tratada) e dieta referência (caseína).

Índices determinados	Dieta	Dieta
	teste ⁽¹⁾	referência ⁽²⁾
Cons. dieta (g/dia/rato)	4,3 ± 0,8	4,3 ± 0,8
Cons. prot. (g/dia/rato)	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Perda de peso (g/dia/rato)	-2,3 ± 0,6	-1,0 ± 0,6**
Perda de peso/consumo proteína (g/dia/rato)	-4,9 ± 1,2	-2,3 ± 1,3**
Tempo de sobreviv. (dias)	5,7 (4-9) ⁽³⁾	-

(1)- o conteúdo de proteína (10%) da dieta teste era fornecido pela caseína (6%) e pela fração albumina não tratada (4%).

(2)- o conteúdo de proteína (10%) da dieta referência era fornecido pela caseína.

(3)- os valores entre parenteses indicam o intervalo de tempo em que ocorreu o início e o término da mortalidade dos animais na dieta teste.

** Significativo ao nível de 1%.

5. DISCUSSÃO

5.1. Composição centesimal

Os valores encontrados para os constituintes do feijão mostram que os conteúdos em proteína e cinza estão próximos dos obtidos por Coelho (1993), quando analisou este mesmo cultivar. Os baixos teores do extrato etéreo e o valor relativamente alto para os carboidratos evidenciam composição similar em relação a outros cultivares desta espécie de leguminosa (Tobim e Carpenter, 1978; Durigan e Sgarbieri, 1987; Sgarbieri, 1989). A composição química da matéria orgânica não nitrogenada do feijão Carioca, determinada por Moraes e Angellucci (1971), mostrou valores de 5,34% para açúcares solúveis, 3,52% para fibra bruta e 7,21% para pentosanas. Os oligossacarídeos, rafinose, estaquiase e verbascose, presentes no feijão, foram estimados por Sathe et al. (1984) e os valores obtidos foram 0,3 a 0,63%; 2,30-3,26% e 0,13 a 0,15%, respectivamente. A matéria orgânica não nitrogenada constituiu, neste estudo, a fração extrativa não determinada.

A alta porcentagem de amido presente no feijão, onde os valores estão entre 34,00 a 44,7% (Moraes e Angellucci, 1971) o evidenciam como sendo o principal carboidrato desta leguminosa (Patil et al., 1975). Raupp (1994) estimou o conteúdo total de fibra alimentar do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' em 14,75%, sendo 5,10% de fração solúvel e 9,65% de fração insolúvel.

Apesar do limitado valor nutricional dos feijões, estes são, quantitativamente, fontes alimentares importantes de proteína, de carboidratos e de minerais, com destaque para o ferro (Sgarbieri et al., 1979; Cabral, 1990).

5.2. Caracterização das frações protéicas

A extratibilidade das proteínas em solução de NaCl com valor de pH ajustado para 2,5 foi de 43%, permanecendo assim uma grande quantidade de proteína no resíduo insolúvel. Os resultados obtidos por alguns pesquisadores indicam valores de 62 a 85% (Durigan e Sgarbieri, 1987; Sgarbieri e Galeazzi, 1990) quando, porém, as proteínas que permaneciam no resíduo eram reextraídas. No entanto, Smith et al. (1959) extraíram 76,2% do nitrogênio do feijão comum, com uma única extração com solução 0,5M de NaCl e Sgarbieri (1979), realizando extração fracionada do feijão 'Rosinha G2' com diferentes solventes, recuperou 98% das proteínas, sendo que 48% delas foram obtidas com uma única extração com água destilada. A variação na extração do nitrogênio total, conforme este autor, está em função da espécie ou cultivar, do tipo e pH do solvente.

Com a diálise e centrifugação do extrato bruto, a fração globulina representou a maior porcentagem da proteína extraída (54%), sendo portanto a fração predominante do 'IAC-Carioca 80 SH', com proporção globulina/albumina de 2,4, estando

dentro dos valores obtidos para outros cultivares (Sathe et al., 1978; Sgarbieri et al., 1979; Sgarbieri e Galeazzi, 1990; Utsumi, 1992).

As albuminas são, principalmente, proteínas ligadas ao metabolismo celular e contêm, praticamente, todos os inibidores de proteases e lectinas. Nesta fração, os inibidores apresentaram 2,3 vezes mais atividade do que o isolado protéico, fato este também observado por Sgarbieri (1979), Sgarbieri e Galeazzi (1990), Wu e Whitaker (1990). A atividade hemaglutinante, também se apresentou mais elevada na fração albumina.

O resíduo insolúvel, obtido após a extração das proteínas, representava apenas 10% da atividade dos inibidores presentes na farinha. As condições de extração visavam a obtenção dos inibidores, e embora 45% das proteínas permanecessem no resíduo, a pequena quantidade de inibidores ativos presentes no material insolúvel, não justificava a sua reextração.

A extratibilidade dos inibidores de tripsina do feijão 'Winged' (*Psophocarpus tetragonolobus*) em função da força iônica e variação do pH de 3 a 9, realizada por Tan et al. (1982), indicou que na presença de alta força iônica (NaCl 10%) a extratibilidade aumentava com a elevação do pH, havendo menor extratibilidade (28%) em pH 3,0. Com baixa força iônica (NaCl 0,1M) neste mesmo pH, 60% dos inibidores foram extraídos, e a menor extração ocorreu em pH 4,0, sugerindo que os inibidores deste feijão são de natureza ácida, com ponto isoelétrico

aparente ao redor de pH 4,0. As extrações das proteínas com alta e baixa força iônica, em pH 3,0 foram 33% e 28%, respectivamente.

Os efeitos do pH e força iônica na atividade dos inibidores foram também estudados por Honig et al. (1987). As proteínas da farinha de soja desengordurada foram extraídas com água, seguida de precipitação ácida (pH 3,5 a 5,2) com ou sem adição de 0,1N NaCl. A acidificação do extrato afetou a distribuição da atividade dos inibidores de tripsina, sendo que 82 e 93% da atividade permaneceram no sobrenadante, após a acidificação do extrato a pH 5,2 e 3,5, respectivamente. A adição de 0,1N de NaCl no extrato ácido (pH 3,5) apresentou resultado similar, e as proteínas extraídas, nestas condições, representavam 40% do total.

A acidificação do extrato protéico foi usada por Pusztai (1966) e Satterlee et al. (1975), como etapa inicial de purificação dos inibidores de tripsina, bem como na obtenção de concentrados protéicos com baixa atividade antinutricional.

As frações não tratadas, isolado protéico e albumina apresentaram bandas protéicas bastante espessa com pesos moleculares entre 30.500 e 35.700 (Rf 0,48 a 0,55). Componentes de peso molecular entre 28.000 e 30.000, como as fitohemaglutininas (Andrews, 1974; Pusztai et al., 1981), contribuem para intensidades destas bandas. Este comportamento eletroforético é semelhante ao obtido por Sgarbieri (1979), no qual a banda protéica mais concentrada da fração albumina

apresentou mobilidade relativa ao redor de 0,46, e esta continha toda atividade hemaglutinante. O aquecimento das frações em água fervente, ocasionou inativação dessas proteínas. As amostras para serem aplicadas no gel eram precedidas de centrifugação, e com isso as proteínas inativadas permaneciam no resíduo, não sendo assim detectada na eletroforese.

As frações protéicas tiveram como características comuns altos teores de ácido glutâmico, ácido aspártico, leucina e lisina e baixos teores de $\frac{1}{2}$ cistina e metionina.

Embora as proteínas do feijão se apresentem deficientes em metionina e $\frac{1}{2}$ cistina (Baldi e Salamini, 1973; Pusztai et al., 1979; Durigan e Sgarbieri, 1987), os valores obtidos por Coelho (1993), para a farinha crua descorticada do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', mostraram-se superiores aos valores médios, normalmente encontrados para os cultivares de feijão.

A composição em aminoácidos das frações tratadas (Quadro 9) mostra uma diminuição relativa do conteúdo de aminoácidos.

O tratamento térmico provoca mudanças na estabilidade estrutural das proteínas, podendo assim ter alterado o tempo de hidrólise dos seus aminoácidos. Dentre os aminoácidos mais afetados pelo aquecimento estão o ácido aspártico e ácido glutâmico, provavelmente em decorrência das ligações cruzadas envolvendo esses aminoácidos.

Além disso, o aquecimento quando intenso, provoca modificações irreversíveis na estrutura das proteínas podendo diminuir a biodisponibilidade dos aminoácidos ao organismo, prejudicando o valor nutritivo da proteína.

5.3. Inativação térmica dos inibidores de tripsina e fitohemaglutinina

Os inibidores de tripsina se apresentaram menos estáveis ao calor, quando os grãos inteiros ou a farinha foram macerados, antes do aquecimento. A influência da umidade para inativação térmica dos inibidores tem sido reportada por vários pesquisadores (Rackis, 1966; Gallardo et al., 1974; Buera et al., 1984; Sharma e Sehgal, 1992). A umidade atua uniformizando o cozimento e proporcionando maior transferência de calor (Cabral, 1981).

O efeito da temperatura e conteúdo de umidade na inativação dos inibidores de tripsina do feijão-guandu foram estudados por Phillips et al. (1983). Observaram que o tempo necessário para equilibrar a temperatura de aquecimento da farinha, diminuía com o aumento da umidade e da temperatura. A 150°C, quando o conteúdo de umidade era 7,5%; 19,4% e 25,5% o equilíbrio foi obtido com 3,0, 2,0 e 1,5 minutos, respectivamente. A porcentagem de inativação dos inibidores

aumentava com a elevação da temperatura e umidade, seguindo o modelo cinético de reação de primeira ordem.

O tratamento térmico aplicado à farinha se apresentou menos eficiente para a inativação dos inibidores, o que é concordante com Borowska e Koslowska (1981) ao observarem que farinha de feijão dispersa em água (1:25, p/v) e aquecida a 100°C por 60 minutos, retinha 20% da atividade, enquanto a fervura do feijão inteiro (100°C por 30 minutos) a retenção foi de 7,8%. Carvalho et al. (1977); Antunes e Sgarbieri (1980) e Dhurandhar e Chang (1990) também reportaram a estabilidade dos inibidores, quando a farinha era aquecida. Assim, a inativação dos inibidores, frente ao tratamento térmico, é também dependente da forma da amostra a ser tratada.

Com o aquecimento em água fervente os inibidores apresentaram maior estabilidade, quando as frações protéicas foram aquecidas, e eram mais facilmente inativados com o aquecimento do grão inteiro do que com a farinha. Estes resultados mostram-se de acordo com os obtidos por Rayas-Duarte et al. (1992).

A eficiência da inativação térmica dos inibidores no grão integral pode ser atribuída ao fato de que nestas condições, os inibidores encontram-se mais próximos, e pela ação do calor, se combinariam com componentes do tecido formando complexos inativos e insolúveis.

Os inibidores de tripsina podem tornar-se inativos, portanto, com o tratamento térmico ao se complexarem com componentes do tecido do grão, o que diminui a eficiência do aquecimento da farinha e das frações protéicas. Ellenrieder et al. (1980) concluíram que componentes de alto peso molecular, separados dos extratos de soja por filtração em gel de Sephadex G-75, aceleraram a inativação térmica do inibidor de tripsina. Tsukamoto et al. (1983) mostraram a inativação do inibidor do feijão 'Kintoky', purificado por filtração em gel de Sephadex G-100, quando aquecidos a 100°C por 60 minutos na presença de substâncias de alto peso molecular, provenientes do feijão. Concluíram que proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos são fatores inativantes, pela interação com os inibidores.

A complexação dos inibidores, como mecanismo de inativação, foi confirmada por Galeazzi e Sgarbieri (1988), pois com a hidrólise enzimática de amostras de feijão 'Carioca 80' inativadas em autoclave, havia uma regeneração da atividade no material, após digestão enzimática.

A influência do pH na inativação térmica dos inibidores também foi estudada, onde estes se apresentaram mais estáveis a pH ácido. Whitaker e Sgarbieri (1981); Tsukamoto et al. (1983), Gruen et al. (1984) concluíram que os inibidores eram mais estáveis ao aquecimento em condições ácidas do que alcalinas. Isto se deve, conforme Sgarbieri (1979), à instabilização das ligações dissulfídicas com a elevação do pH e à predominância de

grupos ácidos nas moléculas, o que os tornam mais estáveis em meio ácido. Gruen et al. (1984) ao estudarem o efeito do pH e temperatura na conformação dos inibidores, mostraram que mudanças conformacionais mínimas ocorrem em pH 3,0, as quais foram progressivamente aumentadas com a elevação do pH para 8 e 11. Concluíram que a perda de atividade pelo aquecimento é devida ao desdobramento da proteína em um processo irreversível.

As hemaglutininas apresentaram-se mais susceptíveis ao aquecimento do que os inibidores de tripsina, sendo também mais estáveis ao calor seco. As condições de aquecimento, como maceração e forma da amostra tratada, tiveram influência na sua inativação o que reafirma o observado por Muelenaere (1964); Jaffé et al. (1972); Antunes e Sgarbieri (1981); Kadam et al. (1987), Bonorden e Swanson (1992); Sharma e Sehgal (1992).

O tratamento térmico das frações protéicas levou à inativação total das hemaglutininas, permanecendo os inibidores ativos, o que concorda com as observações de Antunes e Sgarbieri (1980) ao constatarem que uma característica comum das fitohemaglutininas é a sua rápida inativação, quando aquecidas em solução aquosa. Com o aquecimento das frações em água fervente, as proteínas sofrem alterações estruturais, que levam à perda da atividade hemaglutinante.

O aquecimento em água fervente por 30 minutos foi, portanto, o procedimento adotado para o tratamento térmico das frações protéicas utilizadas nos ensaios biológicos.

5.4. Caracterização química/estrutural dos inibidores de tripsina da fração albumina

O aquecimento da fração albumina permitiu recuperar quase toda atividade inicial dos inibidores de tripsina (Quadro 10), e levou a uma purificação de 2,1 vezes. Da mesma forma, os inibidores do feijão 'Rosinha G2' foram purificados 2,3 vezes por Sgarbieri (1979), e 1,1 vezes por Rayas-Duarte et al. (1992), com auxílio do tratamento térmico.

A obtenção dos inibidores por cromatografia de afinidade, possibilitaram uma purificação de 30 vezes, com uma recuperação de 64% da atividade, representando 2,14% da proteína da fração albumina, e aproximadamente 0,08% da farinha integral do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', semelhante aos valores obtidos por Gomes et al. (1979), Wu e Whitaker (1990) e Rayas-Duarte et al. (1992), para outros cultivares.

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Figura 7) em condições não desnaturantes, indica a existência de três isoinibidores na fração albumina do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', quando purificados por cromatografia de afinidade. A ocorrência de vários isoinibidores de tripsina tem sido relatada para o gênero *Phaseolus*, sendo seis para feijão comum (Jacob e Pattabiraman, 1986); três para feijão 'Great Northern' (Wilson e Laskowiki, 1973; Rayas-Duarte et al., 1992), três para feijão

'Rosinha G2' (Whitaker e Sgarbieri, 1981) e quatro para feijão comum (Wu e Whitaker, 1990).

Na fração albumina não precipitada pelo aquecimento também foram detectadas três bandas protéicas referentes aos inibidores de tripsina, quando a eletroforese foi realizada na presença de SDS e a revelação das bandas efetuada através da coloração do gel por nitrato de prata.

A albumina, para ser adicionada à Sepharose-tripsina foi equilibrada em tampão TRIS 0,02M pH 8,0 contendo 0,4M NaCl e em seguida foi centrifugada. Este procedimento, conforme Figuras 5, perfil 4 e Figura 9, perfil 2, realizada em condições desnaturantes, levou à não detecção de bandas protéicas com menor mobilidade, que se precipitavam com o procedimento realizado.

As possíveis modificações decorrentes da purificação dos inibidores por cromatografia de afinidade, devido a proteólise (Fritz et al., 1971) podem ser evitadas com o uso de anidrotripsina (Xavier Filho e Campos, 1983). No entanto neste estudo, para prevenir tais modificações e minimizar a adsorção de outras proteínas à matriz Sepharose-tripsina, saturou-se a coluna de afinidade com os inibidores, o que levou a uma recuperação relativamente baixa, porém intencional. Nestas condições, pela análise do comportamento eletroforético da fração albumina (Figura 6, perfil 1)) não se observou a formação de novos componentes, após cromatografia de afinidade (Figura 7), indicando que os três isoinibidores são componentes da fração

albumina do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' e não produtos formados durante a purificação.

A composição em aminoácidos do inibidor purificado por cromatografia de afinidade (Quadro 11), assemelha-se à composição do inibidor do tipo Bowman-Birk. Os inibidores isolados do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' são similares ao inibidor A do feijão 'Rosinha G2' (Whitaker e Sgarbieri, 1981) com relação aos teores de treonina, serina, prolina, $\frac{1}{2}$ cistina e o feijão 'Lima' (Jones et al., 1963) nos conteúdos de treonina, serina, glicina, valina, isoleucina, leucina.

O alto conteúdo em $\frac{1}{2}$ cistina, ácidos aspártico e glutâmico e teores muito baixos, ou ausência, de triptofano e metionina, é uma característica dos inibidores isolados de *Phaseolus*, sendo que variações ocorrem entre as espécies e cultivares.

A composição em aminoácidos da fração albumina não precipitada pelo calor, do feijão 'IAC-Carioca 80 SH', apresenta-se semelhante à obtida para o feijão 'Rosinha G2' por Sgarbieri (1979), com exceção dos conteúdos em prolina, glicina e alanina, que foram mais elevados para esta fração no presente estudo.

Os inibidores de tripsina obtidos por cromatografia de afinidade apresentaram pesos moleculares de 15.750, 20.700 e 22.160 quando estimado pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (Figura 9). Os valores relatados na literatura para o peso molecular dos inibidores de tripsina provenientes de

feijão estão entre 8.000 e 20.000, dependendo do cultivar e do método usado para sua determinação (Wang, 1975; Whitley e Bowman, 1975; Tsukamoto et al., 1983; Jacob e Pattabiraman, 1986; Wu e Whitaker, 1990).

Os inibidores de tripsina, isolados da fração albumina do feijão 'Navy', por Gomes et al. (1979) apresentaram peso molecular de 16.600 para o componente de maior concentração no gel contendo SDS; 11.900 quando estimado pela interação inibidor-tripsina, e peso molecular mínimo de 12.214 ao ser calculado pela composição em aminoácidos.

Os valores reportados por Wu e Whitaker (1990) para os inibidores de tripsina do feijão comum estiveram entre 9.000 e 11.000, quando determinados, respectivamente, pela composição em aminoácidos e pela filtração em gel com uréia 6M. No entanto, obtiveram valores mais elevados (ao redor de 20.000) quando determinados pela eletroforese contendo SDS ou pela filtração em gel (17.000). O peso molecular de 20.000 foi determinado para os inibidores isolados do feijão 'Rosinha G2', por Sgarbieri (1979) por três métodos físico-químicos diferentes, isto é ultracentrifugação em gradiente de densidade (5-20% sacarose), eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e filtração em coluna de Sephadex G-100.

Algumas possibilidades têm sido relatadas, para explicar as discrepâncias encontradas na determinação do peso molecular dos inibidores, por eletroforese em gel de

poliacrilamida contendo SDS. Tem sido proposto que na presença deste detergente as proteínas se tornam carregadas negativamente, e a separação eletroforética ocorra em função do tamanho (Weber e Kuter, 1971; Svasti e Parrijpan, 1977). Entretanto, Rodbard (1976) admite que a situação ideal, onde a presença de detergente com alta carga iônica resulta em densidade de cargas uniformes para todas proteínas, incluindo as padrão e desconhecidas, nem sempre é conseguida na prática. Assim, nestas condições a obtenção de peso molecular mais elevado poderia ser atribuída à ligação de quantidades inadequadas de SDS ao inibidor, a algum fator intrínscico, ou à conformação do complexo proteína-SDS (Banker e Cotman, 1972) ou a fatores ainda desconhecidos.

Além disso, Wu e Whitaker (1990) admitem que a oxidação da cisteína durante a eletroforese, tem como consequência o espessamento das bandas protéicas dos inibidores, porém tal tratamento não influenciaria a mobilidade. Estes autores observaram ainda que, quando as pontes dissulfeto dos inibidores eram clivadas e os grupos tióis bloqueados pelo tratamento com 2-nitro-5-tiosulfobenzoato (NTSB), a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, apresentaram bandas protéicas bem definidas, porém com os pesos moleculares aparentemente elevados.

Rayas-Duarte et al. (1992) sugeriram que a diferença obtida para o peso molecular dos inibidores purificados do feijão 'Great Northern', quando estimado pela filtração em gel e pela

eletroforese contendo SDS, é devida à tendência de interação inibidor-inibidor, formando dímeros, quando não desnaturados totalmente pelo aquecimento com SDS e mercaptoetanol. De fato, a formação de dímeros e tetrâmeros também tem sido relatada por vários autores, para os inibidores do tipo Bowman-Birk do feijão 'Kidney' (Puszai, 1968; Wu e Whitaker, 1990), do feijão 'Navy' (Whitley e Bowman, 1975) e da soja (Birk, 1985).

Assim sendo, somente após um estudo sistemático do efeito de agentes desagregantes, de agentes redutores e da obtenção de cada fração do inibidor purificado, é que se poderá obter respostas mais conclusivas a respeito do peso molecular dos inibidores do feijão 'IAC-Carioca 80 SH'.

Os inibidores purificados pela cromatografia de afinidade inibiram a tripsina e a α -quimotripsina na proporção aproximada (p/p) 1:1. Nas mesmas condições de purificação dos inibidores de tripsina do feijão 'Rosinha G2', Whitaker e Sgarbieri (1981) obtiveram valor de 0,88 (peso/peso) para a proporção tripsina:inibidor, enquanto Wu (1989) observou que esta proporção foi 1,19 para este mesmo cultivar, e 1,82 para o feijão comum.

As inibições das enzimas, tripsina e quimotripsina, pelos inibidores da fração albumina não precipitada pelo aquecimento, foram lineares somente até 69% e 50%, respectivamente. Nesta fração estão presentes outras proteínas, além dos inibidores de tripsina, que em contato com proteases,

sob condições fisiológicas, formam o complexo Michaelis-Menten (enzima-substrato). Quando os inibidores estão presentes, estes competem com a enzima, formando um complexo muito estável (Weder, 1981).

Algumas suposições tem sido relatadas para explicar a interação enzima-inibidor. Conforme observações compiladas de vários pesquisadores por Sgarbieri (1979) o inibidor teria pelo menos um ponto de interação com o centro ativo da enzima e as interações do inibidor com a tripsina seriam, principalmente, do tipo eletrostático; ou o inibidor e tripsina formariam um complexo não covalente, em que o sítio ativo da enzima ficaria bloqueado por impedimento estereoquímico, de forma a impossibilitar o acesso da enzima ao substrato; ou ainda, a grande afinidade desses inibidores pela tripsina e vice-versa, seria o resultado de muitas interações fracas do tipo hidrofóbica (Van der Waals) que expulsaria a água da área de contato das duas proteínas.

A diminuição da inibição da tripsina e α -quimotripsina em concentrações mais elevadas do inibidor, pode ser atribuída à presença das outras proteínas na fração albumina não precipitada pelo aquecimento, que competem com o substrato sintético ou à parcial dissociação do complexo enzima-inibidor, devido às características que cada um dos inibidores podem apresentar em relação à sua interação com a enzima. Esta interpretação é suportada pelo fato de que o comportamento bifásico obtido sugere

a presença de duas famílias de sítios de ligações ou a presença de dois tipos de moléculas distintas que poderiam ligar-se no mesmo sítio ativo. Somente após uma purificação e um estudo de inibição de cada fração é que poder-se-á esclarecer este comportamento.

Na caracterização dos inibidores do feijão 'IAC-Carioca 80 SH' purificados pela cromatografia de afinidade, os resultados obtidos tais como: altos níveis em $\frac{1}{2}$ cistina, serina e ácido aspártico, e baixos teores de glicina, valina e metionina, proporção de inibição da tripsina e α -quimotripsina 1:1, mostram similaridade com os inibidores da família Bowman-Birk.

5.5. Efeito dos fatores antinutricionais na qualidade da proteína

A dieta contendo albumina não tratada causou a morte de todos os animais em um período de 3-5 dias. Os animais apresentaram maiores ganhos em peso, quando colocados em dieta com frações tratadas e os que receberam dieta contendo isolado protéico não tratado perderam peso (Quadro 13). As dietas elaboradas com a mesma fração, tratada ou não, com atividade dos inibidores relativamente semelhantes (Quadro 12) e todas suplementadas com aminoácidos sulfurados, apresentaram respostas diferentes no ganho em peso, indicando a efetividade do aquecimento na melhoria da qualidade nutricional das proteínas.

Os animais alimentados com dieta contendo frações protéicas tratadas ou não tratadas, excretaram uma quantidade de nitrogênio fecal significativamente maior ($P < 0,05$) em relação aos ratos submetidos à dieta de caseína e aprotéica, podendo ser atribuída à descamação das células epiteliais da mucosa intestinal (Bender e Mohammadiha, 1981), à atividade da flora intestinal (Faiweatker-Fait et al., 1983) e à presença de hemaglutininas ativas nas frações não tratadas (Jaffé e Brücher, 1972).

O consumo de dieta contendo proteínas de feijão levou a um aumento significativo na excreção de nitrogênio fecal, tendo como consequência a diminuição da digestibilidade.

Os valores para a digestibilidade das proteínas das dietas contendo frações protéicas do feijão se apresentaram significativamente ($P < 0,05$) menores do que o da caseína (Quadro 15), e dentre estas a que continha isolado protéico não aquecido se mostrou a de menor qualidade nutricional. O baixo valor nutricional da fração isolado protéico pode também ser atribuído à composição em aminoácidos, que nesta fração se apresentou mais desequilibrada. A suplementação das dietas que contém proteínas de feijão, com aminoácidos sulfurados, tem se mostrado efetiva na melhora da qualidade nutricional. Neste estudo, porém, tal adição não previniu o efeito letal da fração albumina não tratada. O tratamento térmico elevou igualmente os valores de digestibilidade das frações, em consequência das alterações

estruturais das proteínas e a inativação das fitohemaglutininas. A fração albumina tratada é tida como resistente à hidrólise enzimática, devido a presença de inibidores de tripsina e elevado conteúdo de ligações dissulfídicas. No entanto os altos valores para a atividade dos inibidores nesta fração, não afetaram a digestibilidade, nem mesmo quando adicionados à dieta contendo globulina aquecida, em relação às outras dietas que continham inibidores menos ativo. Vários pesquisadores também observaram a falta de relação da atividade dos inibidores com os índices de valor nutricional (Sgarbieri, 1979; Mancine Filho e Lajolo, 1981; Durigan e Sgarbieri, 1987).

Através da determinação da utilização líquida da proteína constatou-se baixo valor nutritivo da dieta contendo isolado protéico e globulina não tratada. Pusztai e Palmer (1977) também mostraram o efeito prejudicial que a adição de lectina à dieta causava ao NPU em ratos alimentados com ração de caseína (5% de proteína), enquanto que a adição de proteína de feijão, isenta de lectina, não mostrava qualquer efeito tóxico.

O efeito letal da fração albumina não tratada, mesmo suplementada com aminoácidos sulfurados, levou à realização de um experimento pareado de alimentação, a fim de se verificar se esta letalidade era provocada pela toxicidade da dieta ou por inanição. O efeito tóxico das proteínas foi confirmado (Quadro 16) pelo índice perda de peso/consumo proteína e ainda pelo tempo de sobrevivência dos animais na dieta, uma vez que seus pares, ao

ingerirem quantidades equivalentes de caseína, sobreviveram, perdendo significativamente menos peso.

A toxicidade das proteínas de feijão relacionada à presença de fitohemaglutininas, foi mostrada por Durigan e Sgarbieri (1987). Pusztai et al. (1975) concluíram que a toxicidade se relaciona diretamente com título hemaglutinante.

6. CONCLUSÕES

1) O aquecimento dos grãos de feijão 'IAC-Carioca 80 SH' em autoclave, após maceração, apresentou-se eficiente para a inativação das fitohemaglutininas e dos inibidores de tripsina, sendo as fitohemaglutininas menos estáveis ao aquecimento. A estabilidade térmica destes fatores antinutricionais foi dependente da forma de amostra a ser tratada.

2) Os três inibidores, com alto conteúdo de $\frac{1}{2}$ cistina e baixo teor de glicina, inibiram a tripsina e α -quimotripsina na proporção de 1:1, características estas semelhantes a de outros cultivares e às apresentadas pelos inibidores da família Bowman-Birk, porém os pesos moleculares apresentaram-se mais elevados. A purificação parcial dos inibidores da fração albumina não precipitada pelo aquecimento levou a um comportamento não linear quanto à inibição da tripsina e α -quimotripsina.

3) As frações protéicas não tratadas tiveram efeito bastante prejudicial ao aproveitamento da ração e ao desenvolvimento dos animais; em consequência da toxicidade das fitohemaglutininas. Enquanto a fração albumina teve efeito letal em ratos recém-desmamados, as frações protéicas tratadas termicamente apresentaram qualidade nutricional melhorada pela inativação das fitohemaglutininas.

4) A presença de proteínas de feijão nas dietas teve como consequência uma diminuição da digestibilidade, porém as

dietas contendo frações tratadas termicamente e inibidores com diferentes níveis de atividade, bem como a adição dos inibidores purificados por cromatografia de afinidade à dieta de globulina tratada, não alteraram os índices nutricionais da proteína, nas condições em que foram avaliados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVA, E.P., CHERNIKOV, M.P. Proteinase inhibitor content in the seeds of some leguminaes seeds. *Voprosy Pitaruja*, v.23, p. 13-16, 1964.
- ANDREWS, A.T. Navy (haricot) bean (*Phaseolus vulgaris*) leetin. Isolation and characterization of two components from a toxic agglutinating extract. *Biochemical Journal*, Colchester, v.139, p. 412-429, 1974.
- ANTUNES, P.L., SGARBIERI, V.C. Influence of time and conditions of storage on technological and nutrition properties of a dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) variety Rosinha G2. *Journal of Food Science*, Chicago, v.44, p. 1707-1706, 1979.
- ANTUNES, P.L., SGARBIERI, V.C. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean *Phaseolus vulgaris*, var. Rosinha G2, protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.28, p. 935-938, 1980.
- ANTUNES, P.L., SGARBIERI, V.C. Propriedades físicas, químicas e nutricionais das proteínas da soja. In: MIYASAKAS, S., MEDINA, J.C. *A soja no Brasil*. Piracicaba: Livrocerec Ltda, 1981, p. 850-857.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis Chemists*. 12 ed. Washington, DC, 1975. 948p.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*, 14th. ed., Washington, D.C., 1984.
- BAKER, D.H. Critical Review. Problems and pitfalls in animal experiments designed to establish dietary requirements for essential nutrients. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 116, p. 2339-2349, 1986.
- BALDI, G., SALAMINI, F. Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species. *Theoretical and Applied Genetics*., Heidebberg, v.43, p. 75-78, 1973.
- BANKER, G.A., COTMAN, C.W. Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.247, p. 5856-5859. 1972.

- BARROGA, C.F., LAURENA, A.C., MENDOZA, E.M. Polyphenol in mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilezek): determination and emoval. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.33, p. 1006-1009, 1985.
- BENDER, A.E., MOHAMMADIHA, M. Low digestibility of legume nitrogen. *Proceedings of the Nutrition Society*. Cambridge, Great Britain, v.40, p. 66A, 1981.
- BIERI, J.G., STOEWESAND, G.S., BRIGGS, G.M., PHILLIPS, R.W., WOODARD, J.C., KNAPKA, D.D. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.107, p. 1340-1348, 1977.
- BIRK, Y. Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and alpha-chymotrypsin from soybean. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.54, p. 378-381, 1961.
- BIRK, Y. Tripsin isoinhibitors from garden beans (*Phaseolus vulgaris*). In: LASZLO, L. *Methods. In Enzymology*, Orlando, New York: Academic Press, 1976. v. 45, p. 710-716 (Part B).
- BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor, trypsin, and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *International Journal of Peptide and Protein Research*, Copenhagen, v.25, p. 113-131, 1985.
- BIRK, Y., GERTLE, A., KHALEF, S. A pare trypsin inhibitor from soybeans. *Biochemical Journal*, Liverpool, v.87, p. 281-284, 1963.
- BISHOP, P.D., PEARCE, G., BRYANT, J.E., RYAN, C.A. Isolation and characterization of the proteinase inhibitor inducing factor from tomato leaves, identity and activity of poly- and oligogalacturonide fragments. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v.259, p.13172-13177, 1984.
- BONORDEN, W.R., SWANSON, B.G. Thermal stability of black turtee soup bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, v.59, p. 245-250, 1992.
- BOONVISUT, S., WHITAKER, J.R. Effect of heat, amylase and disulfide bond cheavage on the "in vitro" digestibility of soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.27, p. 1256-1262, 1979.

- BOOTH, A.N., ROBBINS, D.J., RIBELIN, W.E., DEEDS, F. Effect of raw soybean meal and aminoacids on pancreatic hipertrophy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Orlando, v.104, p. 681-683, 1960.
- BOROWSKA, J., KOZLOWSKA, H. Changes in activity of trypsin inhibition in bean (*Phaseolus vulgaris*) and pea seeds (*Pisum sativum*) during heat treatment. *Acta Alimentaria Polonica*, Warsaw, v.7, p. 181-188, 1981.
- BOWMAN, D.E. Fractions derived from soybeans and navy bean which retard tryptic digestion of casein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Orlando, v. 57, p. 139-144, 1944.
- BOWMAN, D.E. Differentiaton of soybean antitryptic factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Orlando, v. 63, p. 547-550, 1946.
- BRENES, R.G., ELIAS, L.G., MOLINA, M.R., LA-FUENTE, G., BRESSANI, R. Changes in chemical composition and nutritive value of common beans and other legumes during house cooking. In: *MEETING ON NUTRITIONAL ASPECTS OF COMMON BEANS AND OTHER LEGUMES SEEDS AS ANIMAL AND HUMAN FOODS*. Ribeirão Preto, SP, 1973. *Proceedings*, p. 93-108.
- BRESSANI, R. Factor that determine the nutritional value of dried beans. Research needs. In: *ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. Advances in bean research: Chemistry, nutrition, technology*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p.1.
- BRESSANI, R., ELIAS, L.G. The nutrition roll of polyphenols in beans. In: HULSE, J.H. *Polyphenols in cereals and legumes*. Ottawa: IDRC, 1980. 61p.
- BRESSANI, R., ELIAS, L.G., VALIENTE, A.T. Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *British Journal of Nutrition*. Cambridge, v.17, p. 69-78, 1963.
- BUERA, M.P., PILOSOFF, A.M.R., BARTHOLOMAI, G.B. Kinetics of trypsin inhibitory activity loss in heated flour from bean, *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Food Science*. Chicago, v.49, p. 124-126 and 136, 1984.

- BURNS, R.A. Protease inhibitors in processed plant foods. *Journal of Food Protection*, Ames, v.50, p. 161-166, 1987.
- BUSHMAN, D.H. *La soya integral para aves*. México: Asociación Americana de soya. 1979, 4p.
- CABRAL, L.C. Processo de obtenção da farinha de soja integral. In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. *A soja no Brasil*. Piracicaba: Livrocereceres Ltda, 1981, p. 868-871.
- CABRAL, M.M.V.N. *Utilização biológica do ferro do feijão Carioca 80SH (Phaseolus vulgaris) na repleção da hemoglobina de ratos anêmicos*. Campinas, 1990. Tese (Mestre em Ciências da Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
- CARBONARO, M., MARLETTA, L., CARNOVALE, E. Factors affecting cystine reactivity in proteolytic digests of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.40, p. 169-173, 1992.
- CARVALHO, C.C.C., JANSON, G.R., HARPER, J.M. Protein quality of an imitant bean powder produced by dry heat processing. *Journal of Food Science*, Chicago, v.42, n.2, p. 553-554, 1977.
- CASTRESANA, M.C., SERRA, M.T., RODRIGUEZ, J.F., ZEJERINA, G. Distribution of lectin during the life cycle of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Science*, Lucknow, v.48, p. 79-88. 1987.
- CHAN, J., DE LUMEN, B.O. Properties of trypsin inhibitor from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seed isolated by affinity chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.30, p. 42-46, 1982.
- CHANG, K.C., SATTERLEE, L.D. Isolation and characterization of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*, Chicago, v.46, p. 1363-1373, 1981.
- CHERNIK, S. S., LEPROVIKY, S., CHAIKOFF, I. L. Dietary factor regulating the enzyme content of the pancreas; changes induced in size and proteolytic activity of the chick pancreas by the ingestion of raw soybean meal. *American Journal of Physiology*, Washington, v.155, p. 33-41, 1948.

- CHUDDY, D., IVANKO, S., SULIK, E., SLESAROVA, L., BYSTRICKY, P. Isolation and some properties of lectin from *Vicia faba* seeds. *Biologia*, Bratislava, v.46, p. 685-692, 1991.
- COAN, M.H., TRAVIS, J. Interaction of human pancreatic proteinases with naturally occurring proteinase inhibitors. In: INTERNACIONAL RESEARCH CONFERENCE ON PROTEINASE INHIBITORS. Belin, *Proceedings*, 1971, p. 294-298.
- COELHO, R.G. *Qualidade protéica e biodisponibilidade da metionina em proteínas do feijão 'IAC-Carioca 80SH' (Phaseolus vulgaris, L.)*. Campinas, 1993. 179p. Tese (Doutor em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- DAVIS, B.J. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.121, p. 404-427, 1964.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Structure. Digestibility relationship of legume 7S proteins. *Journal of Food Science*, Chicago, v.54, p. 108-113, 1989.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Conformational characteristics of legume 7S globulins as revealed by circular dichroic, derivative U.V. absorption and fluorescence techniques. *International Journal of Peptide and Protein Research*, Copenhagen, v.35, n. , p. 25-38, 1990.
- DESPHANDE, S.S., NIELSEN, S.S. In vitro enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris*, L. *Journal of Food Science*, Chicago, v.52, p. 1326-1329, 1987.
- DESHPANDE, S.S., SATHE, S.K., SAHUNKHE, D.K., ORNFORTH, D.P. Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols, and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, Chicago, v.47, p. 1946-1949, 1982.
- DHURANDHAR, N.U., CHANG, K.S. Effect of cooking on firmness, trypsin inhibitors, lectins and cystine, cysteine content of navy and red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*, Chicago, v.55, p. 470-474, 1990.
- DURIGAN, J.F. *Estudo da toxidez, composição e valor nutritivo das proteínas de cultivares brasileiros de feijão (Phaseolus vulgaris, L.)*. Campinas, 1985. 154p. Tese

- (Doutor em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.
- DURIGAN, J.F., FALEIROS, R.R.S., LAM-SANCHEZ, A. Determinação das características tecnológicas e nutricionais de diversas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). I- Características tecnológicas. *Científica*, Jaboticabal, v.6, p. 215-223, 1978.
- DURIGAN, J.F., SGARBIERI, V.C. Antinutritional factors and toxicity in raw dry beans (*Phaseolus vulgaris*) of 12 brazilian cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, Westport, v.11, p. 185-200, 1987.
- ELLENRIEDER, G., GERONAZZO, H., DE BOJARSKI, A.B. Thermal inactivation of trypsin inhibitors in aqueous extracts of soybeans, peanuts, and kidney beans: Presence of substances that accelerate inactivation. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.57, p. 25-27, 1980.
- ERLANGER, B.F., EDEL, F., COOPER, A.G. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Orlando, v.115, p. 206-210, 1966.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Orlando, v.95, p. 271-278, 1961.
- EVANS, R.J., BAUER, D.H., SISAK, K.A., RYAN, P.A. The availability for the rat of methionine and cystine contained in heated dry bean seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.22, p. 130-133, 1974.
- EVANS, R.J., BAUER, D.H. Studies on the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.26: 779-784, 1978.
- FAIRWEATHER-FAIT, 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. *British Journal of Nutrition*. Cambridge, v.49, p. 303-312, 1983.
- FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Energy and protein*

- requirements. *Technical Report Series 522*, Geneva, p. 53, 1973.
- FEENEY, P.P. Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsin. *Phytochemistry*, Oxford, v.8, p. 2119-2126, 1969.
- FEENEY, R.E., MEANS, G.E., BIGLER, J.C. Inhibition of human trypsin plasmin and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 244, p. 1957-1960, 1969.
- FERNANDEZ, R., ELIAS, L.G., BRAHAM, J.E., BRESSANI, R. Trypsin inhibitors and hemagglutinins in beans (*Phaseolus vulgaris*) and their relationship with the content of tannins and associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.30, p. 734-739, 1982.
- FIGARELLA, C., NEGRI, G.A., GUY, O. The two human trypsinogens. Inhibition spectra of the two human trypsinogens derived from the purified zymogens. *European Journal of Biochemistry*, Heidelberg, v.53, p. 457-463, 1975.
- FIGUEIROA, M.O.R. *Efeito de modificações químicas na ação tóxica das fitohemaglutininas do feijão (Phaseolus vulgaris, L.)*. São Paulo, 1989. p. 122. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo).
- FINARDI FILHO, F., LAJOLO, F.M. Isolation and characterization of the amylase inhibitor of the black bean (*Phaseolus vulgaris*). In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research, Chemistry, nutrition, technology*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p.21.
- FRITZ, H., BREY, B., MEULLER, M., GEBHARDT, M. Specific isolation and modification methods for proteinase inhibitors and proteinases. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON PROTEINASE INHIBITORS. Berlin, *Proceedings*, 1971. p. 28-37.
- GALLARDO, F., ARAYA, H., RAK, N., TAGLE, M.A. Fatores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. Inhibidor de tripsina. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Caracas, v.24, p. 183-189, 1974.

- GALEAZZI, M.A.M., SGARBIERI, V.C. Inactivation and reactivation of trypsin inhibitors in different bean varieties. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry, nutrition, technology.* São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1988, p. 15.
- GERTLER, A., YEHUDITH, B., BONDI, A. A comparative study of the nutritional and physiological significance of pure soybean trypsin inhibitors and of ethanol extracted soybean meals in chicks and rats. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.91, p. 358-367, 1967.
- GLICK, Z., JOSLYN, M.A. Food intake depression and other metabolic effects of tannic acid in the rat. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 100, p. 509-515, 1970.
- GOMES, J.C., KOCH, U., BRUNNER, J.R. Isolation of a trypsin inhibitor from navy beans by affinity chromatography. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.56, p. 525-529, 1979.
- GREEN, G.M., LYMAN, R.L. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Orlando, v.140, p. 6-12, 1972.
- GRUEN, L.C., TAO, Z.J., KORTT, A.A. Stability and physiochemical properties of a trypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC). *Biochemica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.791, p. 285-293, 1984.
- GUMBMANN, M.R., RACKIS, J.J., LIENER, I.E., SPANGLER, W.L. The USDA trypsin inhibitor study. III. Pancreatic effects of dietary trypsin inhibitor in rats for two years. *Federation Proceedings*, Bethesda, v.43, p. 792-795, 1984.
- GUMBMANN, M.R., SPANGLER, W.L., DUGAN, G.M., RACKIS, J.J., LIENER, I.E. The USDA trypsin inhibitor study IV. The chronic effects of soy flour and soy protein isolate on the pancreas in rats after two years. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, Dordrecht, v.35, p. 275-314, 1985.
- HABEEB, A.F.S.A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*, New York, v.14, p. 328-336, 1966.

- HAM, W.E., SANDSTEDT, R.M. A proteolytic inhibiting substance in the extract of unheated soybean meal. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 154, p. 505-506, 1944.
- HAMAKER, R., KIRLEIS, A.W., BUTLER, L.C., AXTELL, J.D., MERTZ, W.T. Improving the *in vitro* protein digestibility of sorghum with reducing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.84, p. 626-628, 1987.
- HAMES, B.D. One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel electrophoresis of proteins, a practical approach*, 2^a ed., HAMES, B.D., RICKWOOD, D., Eds., IRL Press: Oxford, England, 1990. p. 1-147.
- HARTREE, E.F. Determination of protein a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, Orlando, v.48, p. 422-427, 1972.
- HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R.F., BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, London, v.330, p. 160-163, 1987.
- HOLM, M., KROGDAHL, A., HANSSSEN, L.E. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vitro* comparison of proteinase inhibitor. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.111, p. 521-523, 1988.
- HONAVAN, P.M., SHIH, C.V., LIENER, I.E. Inhibition of the grow of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.77, p. 109-114, 1962.
- HONIG, D.H., RACKIS, J.J., WOLF, W.J. Effects of pH and salt on yields, trypsin inhibitor content, and mineral levels of soybeans protein isolates and wheys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.35, p. 967-971, 1987.
- ISHIKAWA, C., WATANABE, K., SAKATA, N., NAKAGAKI, C., NAKAMURA, S., TAKAHASHI, K. Adzuki bean (*Vigna angularis*) protease inhibitors: isolation and amino acid sequences. *Journal of Biochemistry*, Tokyo, v.97, p. 55-70, 1985.
- JACOB, R.T., PATTABIRAMAN, T.N. Nature plant enzyme inhibitors: Isolation and properties of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from Kidney bean (*Phaseolus*

- vulgaris*). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. New Delhi, v.23, p. 105-109, 1986.
- JAFFÉ, W.G. Toxic factors in beans: their practical importance. In: MEETING ON NUTRITIONAL ASPECTS OF COMMON BEANS AND OTHER LEGUME - SEEDS AS ANIMAL AND HUMAN FOODS, 6-9 novembro 1973; Ribeirão Preto. Proceedings, p. 199-210.
- JAFFÉ, W.G., BRÜCHER, O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Caracas, v.22, p. 267-281, 1972.
- JAFFÉ, W.G., CAMEJO, G. La acción tóxica de caraotas negras aisladas (*Phaseolus vulgaris*) sobre la absorción intestinal em ratas. *Acta Científica Venezolana*, Caracas, v.12, p. 59-63, 1961.
- JAFFÉ, W.G., BRÜCHER, O., PALLOZO, A. Detection of four types of specific phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Zeitschrift fuer Immunitaetsforschung Experimentelle und Klinische Immunologie*, Stuttgart-Hohenheim, v. 142, p. 439-445, 1972.
- JAFFÉ, W.G., PLANCHART, A., PAE PUMAR, J.I., TORREALBA, R., FRANCESCHI, D.N. Nuevos estudios sobre un factor toxico de las caraotas crudas (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Venezolanos de Nutricion*, Caracas, v.6, p. 195-205, 1955.
- 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 de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- JANZEN, D.H., JUSTER, H.B., LIENER, I.E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science*. Washington, v.192, p. 795-796, 1976.
- JINDAL, S., SONI, G.L., RATTAN, S. Biochemical and histopathological studies in albino rats fed on soybean lectin. *Nutritional Reports International*, Los Altos, v.29, p. 95-106, 1984.
- JOHNSON, A., HURWITZ, R., KRETCHMER, N. Adaptation of rat pancreatic amylase and chymotrypsinogen to changes in diet. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.107, p. 87-96, 1977.

- JONES, G., MOORE, S., STEIN, W.H. Properties of chromatographically purified trypsin inhibitors from lime beans. *Biochemistry*, Tokyo, v.2, p. 66-71, 1963.
- JUNQUEIRA, R.G., SGARBIERI, V.C. Isolation and general properties of lectins from the bean (*Phaseolus vulgaris*, L. var. Rosinha G2). *Journal of Food Biochemistry*, Westport, v.5, p. 165-179, 1981.
- KADAM, S.S., SMITHARD, R.R., EYRE, M.D., ARMSTRONK, D.G. Effects of heat treatments of antinutritional factors and quality of proteins in winged bean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, v.39, n.3, p. 267-275, 1987.
- KAKADE, M.L., SIMONS, N., LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substract for measuring the anti tryptic activity of soybean samples. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.46, n.5, p. 518-526, 1969.
- KAKADE, M.L., HOFFA, D.E., LIENER, I.E. Contribution of trypsin inhibitor to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 103, p. 1772-1778, 1973.
- KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., MCGHEE, J.E., PUSKI, G. Determination of trypsin activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemists*. Saint Paul, v.51, p. 376-382, 1974.
- KANAMORI, M., IKEUCHI, T., IBUKI, F., KOTARU, M., KAN, K.K. Aminoacid composition of protein fractions extracted from *Phaseolus* beans and the Field beans (*Vicia faba*, L.). *Journal of Food Science*, Chicago, v.47, p. 1991-1994, 1982.
- KANESIRO, M.A.B., FALEIROS, R.R.S., BELLINGIERI, P.A., ALBERTINI, P.E.G. Metabolismo nitrogenado em *Lycopersicon esculentum* Mill, cultivar roma VF (tomateiro) cultivado em vaso. IV- Variação dos teores de carboidratos. *Científica*, Jaboticabal, v.5, p. 276-280, 1977.
- KAPOOR, A.C., GUPTA, Y.P. Trypsin inhibitor activity in soybean seed as influenced by stage of its development and different treatments and the distribution in its anatomical parts. *Indian Journal of Nutrition and Dietetics*, Coimbatore, v.15, p. 429-434, 1978.

- KOHN, J., WILCHEK, M. A new approach (cyano-transfer) for cyanogen bromide activation of Sepharose at neutral pH, which yields activated resins, free of interfering nitrogen derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v.107, p. 878-884, 1982.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *Journal of General Physiology*, New York, v.29, p. 149-154, 1946.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p. 680-685, 1970.
- LANFER-MARQUEZ, U.M., LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumins, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.29, p. 1068-1074, 1981.
- LANFER-MARQUEZ, U.M., LAJOLO, F.M. Digestibility of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) albumins and globulin G1: contribution of endogenous nitrogen and sulfur. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. *Advances in bean research. Chemistry, nutrition, technology*. Proceedings. Universidade de São Paulo, 1988, p. 35-43.
- LIENER, I.E. Soyin, a toxic protein from the soybean. 1. Inhibition of rat growth. *Journal of Nutrition*. Bethesda, v.49, p. 527-539, 1953.
- LIENER, I.E. Toxic factors and their elimination. *Annalitical Journal Clinical Nutrition*, v.11, p. 281-296, 1962.
- LIENER, I.E. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. *Journal of Food Science*. Chigado, v.41, p. 1076-1081, 1976.
- LIENER, I.E. Significance for humans of biology active factors in soybeans and other legumes. World Conference on Vegetable Food Proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Champaign, v.56, p. 121-129, 1979a.
- LIENER, I.E. The nutritional significance of plant protease inhibitor. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, v.38, p. 109-113, 1979b.
- LIENER, I.E. Toxic constituents of plant foodstuffs. 2 ed. New York: Academic Press, 1980.

- LIENER, I.E., KAKADE, M.L. Protease Inhibitors. In: LIENER, I.E. *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. New York; Academic Press, 1969. p. 8-68.
- LIENER, I.E., KAKADE, M.L. Protease Inhibitors. In: LIENER, I.E. *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. 2 ed. New York: Academic Press, 1980. p. 7-71.
- LIENER, I.E., NITSAN, Z., SRISANGNAM, C., RACKIS, J.J., GUMBANN, M.R. The USDA trypsin inhibitor study. II Time related changes in the pancreas of rats. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, Dordrecht, v.35, p. 243-257, 1985.
- LIENER, I.E., THOMPSON, R.M. In vitro and in vivo studies on the digestibility of the major storage protein of the navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Foods for Human Nutrition*, Oxford, v.30, p. 13-25, 1980.
- LUCAS, B., SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of food. *Analytical Biochemistry*. Orlando, v.109, p. 192-197, 1980.
- LYMAN, R.L., LEPKOVASKY, S. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.62, p. 269-284, 1957.
- MANCINI FILHO, J., LAJOLO, F.M. Fatores antinutricionais em diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.33, p. 94-97, 1981.
- MARX, J.L. Looking at lectins: do they function in recognition processes. *Science*, Washington, v. 196. p. 1429-1430, 1977.
- MCDONOUGH, F.E., BODWELL, C.E., STAPLES, R.S., WELLS, P.A. Rat bioassays for methionine availability in 16 food sources. *Plant Foods for Human Nutrition*, Oxford, v.39, p. 77-84, 1989.
- MCGUINNESS, E.E., MORGAN, R.G.H., LEVISON, D.A., FRAPE, D.L., HOPWOOD, D., WORMSLEY, K.G. The effects of long-term feeding of soya flour on the rat pancreas. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Toyen, v.15, p. 497-502, 1980.

- MEYER, J.H., KELLY, G.A. Canine pancreatic responses to intestinally perfused proteins and protein digests. *American Journal of Physiology*, Bethesda, v. 231, p. 682-691, 1976.
- MILLER, S.D., BENDER, A.E. Determination of the net utilization of protein by a shortened method. *The British Journal of Nutrition*. Cambridge, v.9, p. 382-388, 1955.
- MITCHELL, H.H. A method of determining the biological value of protein. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.58, p. 873-903, 1923/24.
- MIYOSHI, M., HAMAGUCHI, Y., MATSUMOTO, K., MIZUNO, I. The isolation and characterization of a trypsin inhibitor from kintoki bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal Nutritional Science Vitaminology*, Tokyo, v.24, p. 195-204, 1978.
- MOORE, S., STEIN, W.H. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, v.6, p. 819-831, 1963.
- MORAES, R.M., ANGELUCCI, E. Chemical composition and amino acid contents of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*, v. 36, p. 493-494, 1971.
- MORAES-SANTOS, T., DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Valor nutritivo de frações protéicas isoladas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Caracas, v.22, p. 547-560, 1972.
- MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, Orlando, v.117, p. 307-310, 1981.
- MUELENAERE, H.J.H. Effect of the heat treatment on haemagglutinating activity of legumes. *Nature*, London, n. 201, p. 1029-1030, 1964.
- NIELSEN, S.S., DESPHANDE, S.S., HERMODSON, M.A. SCOTT, M.P. Comparative digestibility of legume storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 36, p. 896-902, 1988.
- NORDSTROM, C.L., SISTRUNK, W.A. Effect of type of beans, soak time, canning media and storage time on quality

- attributes and nutritional value of canned dry beans. *Journal of Food Science*, Chicago, v.42, p. 795-798, 1977.
- OLIVEIRA, A.C., SGARBIERI, V.C. Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.116, p. 2387-2392, 1986.
- OSBORNE, T.B., MENDEL, L.B. The use of soybean as food. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.32, p. 369-387, 1917.
- PANT, R., TULSIANI, D.R.P. Solubility amino acid composition and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.17, p. 361-379, 1969.
- PAP, A., BERGER, Z., VARRO, V. Beneficial effect of a soy flour diet in chronic pancreatitis. *Mount Sinai Journal of Medicine*, New York, v.50, p. 208-212, 1983.
- PATIL, S.K., TSEN, C.C., LINEBACK, D.R. Water-soluble pentosans of wheat flour. I. Viscosity properties and molecular weight estimated by gel filtration. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.52, p. 45-56, 1975.
- PHILLIPS, R.D., CHHINNAN, M.S., MENDOZA, L.G. Effect of temperature and moisture content on the Kineds of trypsin inhibitor activity, protein in vitro digestibility and nitrogen solubility in cowpea flour. *Journal of Food Science*, Chicago, v.48, p. 1863-1868, 1983.
- POWERS, J.R., WHITAKER, J.R. Purification and some physical and chemical properties of red Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitor. *Journal of Food Biochemistry*, Westport, p. 217-238, 1977.
- PUSZTAI, A. The isolation of two proteins, glycoprotein I and a trypsin inhibitor, from the seeds of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochemical Journal*, Colchester, v.101, p. 379-384, 1966.
- PUSZTAI, A. General properties of a protease inhibitor from the seeds of Kidney bean. *European Journal of Biochemistry*, Heidelberg, v.5, p. 252-259, 1968.
- PUSZTAI, A., CLARKE, E.M.W., KING, T.P., STEWART, J.C. Nutritional evaluation of Kidney beans (*Phaseolus*

- vulgaris*): Chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v.30, p. 843-848, 1979.
- PUSZTAI, A., GRANT, G., PALMER, R. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): The isolation and partial characterization of toxic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, v.26, p. 149-156, 1975.
- 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*, v. 32, p. 1037-1046, 1981.
- PUSZTAI, A., GRANT, G., OLIVEIRA, J.T.A. Local (gut) and systemic responses to dietary lectins. *FORUM*, Hannover, v.4, p. 205-208, 1986.
- PUSZTAI, A., GRANT, G., STEWART, J.C., WATT, W.B. Isolation of soybean trypsin inhibitors by affinity chromatography on anhydrotrypsin-Sepharose 4B. *Analytical Biochemistry*, Orlando, v.172, p. 108-112, 1988.
- PUSZTAI, A., PALMER, R. Nutritional evaluation of Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the toxic principle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, v. 28, p. 620-623, 1977.
- PUSZTAI, A., WATT, W.B., STEWART, J.C. A comprehensive scheme for the isolation of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 39, p. 862-866, 1991.
- RACKIS, J.J. Soybean trypsin inhibitors their inactivation during meal processing. *Food Technology*, Chicago, v.20, p. 1482-1484, 1966.
- RACKIS, J.J., MCGHEE, J.E., BROTH, A.N. Biological threshold levels of soybeans trypsin inhibitors by rat bioassay. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 52, p. 85-90, 1975.
- RAUPP. D.S. *Caracterização nutricional da fibra alimentar, solúvel e insolúvel do feijão 'Carioca 80SH' em dietas experimentais com ratos.* Campinas, 1994. 145p. Tese (Doutor em Ciências da Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

- RAYAS-DUARTE, P., BERGERON, D., NIELSEN, S.S. Screening of heat-stable trypsin inhibitors in dry beans and their partial purification from great Northern beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin Sepharose affinity chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.40, p. 32-42, 1992.
- RAYAS-DUARTE, P., SATTERLEE, L.D., ROMERO, A.L. Enzymatic release of peptides, methionine and cystine from dry beans following various heat treatments. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 53, p. 468-472, 1988.
- REA, R.L., THOMPSON, L.V., DAVID, J.A., JENKINS, D.M. Lectins in food and their relation to starch digestibility. *Nutrition Research*, Elmsford, v.5, p. 919-929, 1985.
- REDDY, I.M., KELLA, N.K.D., KINSELLA, J.E. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.36, p. 737-741, 1988.
- 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-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.123, p. 1939-1951, 1993.
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganismos. *Phytochemistry*, Oxford, v.16, p. 159-169, 1977.
- RODBARD, D. Estimation of molecular weight by gel filtration and gel electrophoresis. I. Mathematical principles. In: CATSIMPOOLAS, N. (ed.). *Methods of Protein Separation*. v.2, Plenum Press: New York, 1976.
- ROMERO, J., RYAN, D.S. Susceptibility of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* to in vitro enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.26, p. 784-788, 1978.
- RYAN, C.A. Synthesis of chymotrypsin inhibitor I protein in potato leaflets. *Plant Physiology*, Bethesda, v.43, p. 1859-1865, 1968.

- RYAN, C.A., BISHOP, P.D., WAIDER-SIMMONS, M., BROWN, W.E., GRATTAM, J.S. Pectis fragments regulate the expression of proteinase inhibitor genes in plants. In: *Cellular and molecular biology of Plant stress*. Alan R. Liss, Inc. p. 319-334, 1985.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Agricultura. *Feijoeiro: Carioca - 80 (sem halo)*. São Paulo: Departamento de Extensão Rural, 1988. (Comunicado Técnico, 74).
- SATHE, S.K., DESHPANDE, S.S., SALUNKE, D.K. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part I: Chemical composition: proteins. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.20, p. 1-46, 1978.
- SATHE, S.K., DESHLANDE, S.S., SALUNKHE, D.K. Dry beans of *Phaseolus*. Part 2: Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.21, p. 41-93, 1984.
- SATTERLEE, L.D., BEMBERS, M., KENDRICK, J.G. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolate. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 40, p. 81-96, 1975.
- SAXENA, H.C., JENSEN, L.S., MCGINNIS, J. Protein metabolism in chicks fed raw soybean meal. *Poultry Science*, Champaign, v.42, p. 788-790, 1963.
- SCHNEEMAN, B.O., CHONG, I., SMITH, L., LYMAN, R.L. Effect of dietary aminoacids, casein, and soybean trypsin inhibition on pancreatic protein secretion in rats. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 107, p. 281-288, 1977.
- SCHNEEMAN, B.O., LYMAN, R.L. Factors involved in the intestinal feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Orlando, v. 148, p. 897-903, 1975.
- SEIDL, D., JAFFÉ, M., JAFFÉ, W.G. Digestability and proteinase inhibiting action of a Kidney bean globulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 17, p. 1318-1321, 1969.
- SGARBIERI, V.C. *Propriedades físico químicas e nutricionais de proteínas de feijão (Phaseolus vulgaris, L.) var.*

- Rosinha G2. Campinas, 1979. 207p. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.
- SGARBIERI, V.C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família leguminosa. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 32, p. 78-84, 1980.
- SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *World Review of Nutrition and Dietetics*, Basel, v. 60, p. 132-198, 1989.
- SGARBIERI, V.C., ANTUNES, P.L., ALMEIDA, L.D. Nutritional evaluation of four varieties of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Food Science*, Chicago, v.44, p. 1306-1309, 1979.
- SGARBIERI, V.C., GALEAZZI, M.A.M. Quantification and some chemical and biochemical characterization of nitrogenous substances from varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Food Biochemistry*, Westport, v.14, p. 233-247, 1990.
- SGARBIERI, V.C., WHITAKER, J.R. Partial characterization of trypsin and chymotrypsin inhibitors from bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha G2); chemical and physical properties. *Journal of Food Biochemistry*, Westport, v.5, p. 215-231, 1981.
- 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.
- SHARMA, A., SEHGAL, S. Effect of domestic processing, cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean (*Vicia faba*). *Plant Foods for Human Nutrition*, Oxford, v.42, p. 127-133, 1992.
- SHARON, N., LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, Washington, v. 177, p. 949, 1972.
- SMITH, A.K., CIRCLE, S.J. Protein in Soybeans: Chemistry and Technology. *AVI Publishing Co.*, Westport, Conn., 1972.
- SMITH, C.R. Jr., EARLE, F.R., WOLFF, J.A., JONES, Q. Comparison of solubility characteristics of selected seed

- UTSUMI, S. Plant food protein engineering. *Advances in Food Research*, Orlando, v.36, p. 89-96, 1992.
- WANG, D. A crystalline protein-proteinase inhibitor from pinto bean seeds. *Biochemica et Biophysica Acta*. Amsterdam, v.393, p. 583-596, 1975.
- WEBER, K., KUTER, D.J. Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.246, p. 4506-4510, 1971.
- WEDER, J.K.P. Protease Inhibitors in the leguminosae. In: *International Legume Conference. Advances in legume systematics*. Kew, England, POLHILL, R.M., RAVEN, P.H., eds., 1981, p. 533-560.
- WESTFALL, R.J., HAUGE, S.M. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flours heated at various temperatures. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 35, p. 379-389, 1948.
- WHITAKER, J.R., SGARBIERI, V.C. Purification and composition of the trypsin - chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha G2. *Journal of Food Biochemistry*, Westport, v.5, p. 197-213, 1981.
- WHITLEY, E.J.Jr., BOWMAN, D.E. Isolation and properties of navy bean proteinase inhibitor componente I. *Archives of Biochemistry and Biophysica*, Orlando, v. 169, p. 42-50, 1975.
- WILSON, K.A., LASKOWISKI, M. Jr. Isolation of three isooinhibitors of trypsin from garden bean, *Phaseolus vulgaris*, having either lysine or arginine at the reactive site. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 248, p. 756-762, 1973.
- WU, C. A new family of plant proteinase inhibitors from beans (*Phaseolus vulgaris*) and their characterization. Davis, 1989. 212p. Dissertation (Doctor of Philosophy). University of California.
- WU, C., WHITAKER, J.R. Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Linden). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 38, p. 1523-1529, 1990.

WU, C., WHITAKER, J.R. Binding and cleavage by trypsin and chymotrypsin at the reactive sites of proteinase inhibitors from brazilian pink beans (*Phaseolus vulgaris*, variety Rosinha G2). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 39, p. 1743-1751, 1991.

XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F.A.P. The use of anhydrotrypsin - Sepharose for isolation of trypsin inhibitors from *Vigna unguiculata* seeds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v.16, p. 11-15, 1983.