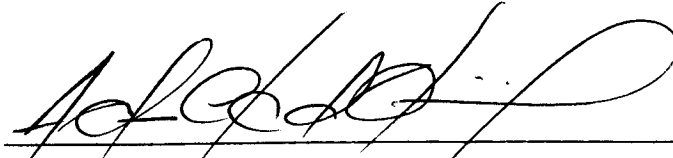


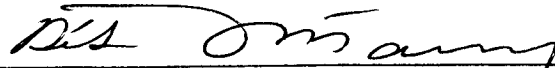
Utilização de ^3H -aminoácidos e ^3H -nucleosídeos para estudar perdas endógenas de nitrogênio em ratos alimentados com dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.).

28 / 92

BANCA EXAMINADORA



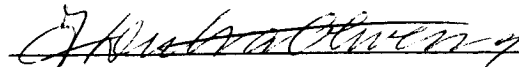
Admar Costa de Oliveira
(Orientador)



Débora de Queiroz Tavares
(Membro)



Edgard de Ferro Collares
(Membro)



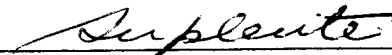
José Eduardo Dutra de Oliveira
(Membro)



José Garrofe D'Orea
(Membro)



Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Membro)



Yong Kun Park
(Membro)

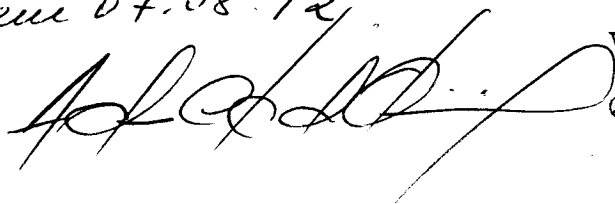
Campinas, 02 de agosto de 1992

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Utilização de ^3H -aminoácidos e ^3H -nucleosídeos para estudar perdas endógenas de nitrogênio em ratos alimentados com dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.).

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Vahideh Rahnemaye Rabbani Jalali e aprovada pela Comissão Julgadora em 07.08.92.



Vahideh Rahnemaye Rabbani Jalali
Química Industrial

Orientador: Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

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

A

Meu pai (em memória)

Minha mãe

Massoud

Com amor e gratidão

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação constante, pelos conhecimentos transmitidos com paciência e dedicação, contribuindo de forma decisiva na conclusão deste trabalho.

A Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares pela valiosa e dedicada colaboração nos trabalhos de radioautografia.

Ao Prof. Dr. Carlos Clemente Cerri e à Profa. Brigitte J.F. Paula Eduardo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, por terem cedido e supervisionado o uso do aparelho Beckman Biological Oxidizer Material.

Ao Prof. Benedicto de Campos Vidal, do Departamento de Biologia Celular/IB/UNICAMP, pela doação dos aminoácidos e nucleosídeos tritiados

Ao Prof. Dr. Gilberto A. Fernandez, Coordenador do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pelas várias discussões esclarecedoras.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pela permissão de acesso ao Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química para uso do cintilador líquido.

A Técnica Yara F. Honório, pela preparação minuciosa

dos cortes histológicos para radioautografia e pelo serviço fotográfico.

A Técnica Judite G. L. Guimarães, pelo apoio nos trabalhos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, pela utilização de seu laboratório fotográfico.

A Universidade Federal de Sergipe e à CAPES-PICD, pelo suporte financeiro.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe, que possibilitaram meu afastamento, assumindo meus encargos.

A Dra. Nosrat Rahnemaye Rabbani, pela sua imensa bondade e carinho.

A Martha e Paulo Samandar, pelas suas maneiras de ser, proporcionando uma convivência familiar amável e tranqüila, possibilitando a minha intensa dedicação a este trabalho.

A Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos, pelo fornecimento das cópias deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP que, de uma forma ou de outra, contribuíram para realização deste trabalho.

SUMARIO

INDICE GERAL.....	8
INDICE DE FIGURAS.....	11
INDICE DE TABELAS.....	15
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO.....	27
REVISAO DA LITERATURA.....	30
MATERIAL E METODOS.....	82
RESULTADOS E DISCUSSAO.....	100
CONCLUSOES.....	149
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	151

2.2.3	Influência da flora bacteriana intestinal na excreção de nitrogênio fecal	71
2.3	Métodos de determinação de nitrogênio endógeno	75
3.	MATERIAL E METODOS	82
3.1	Material	82
3.1.1	Feijão	82
3.1.2	Caseína	82
3.1.3	Ração comercial	82
3.1.4	Aminoácidos marcados com trítio	83
3.1.5	Nucleosídeos marcados com trítio	84
3.1.6	Animais utilizados nos ensaios biológicos	85
3.2	Métodos	86
3.2.1	Análises químicas e bioquímicas.....	86
3.2.1.1	Umidade	86
3.2.1.2	Lipídios	86
3.2.1.3	Cinzas	86
3.2.1.4	Fibra	86
3.2.1.5	Nitrogênio	86
3.2.1.6	Proteína	87
3.2.1.7	Determinação da radioatividade do trítio	87
3.2.1.8	Determinação de RNA	87

3.2.1.9	Cortes histológicos	88
3.2.1.10	Radioautografia	88
3.2.1.11	Técnica fotográfica	89
3.2.2	Ensaaios biológicos	89
3.2.2.1	Preparação da farinha integral de feijão cozido	89
3.2.2.2	Preparação das dietas	90
3.2.2.3	Determinação da digestibilida- de e valor biológico	94
3.2.2.4	Ensaio A	94
3.2.2.5	Ensaio B	95
3.2.2.6	Ensaio C	96
3.2.2.7	Ensaio D	97
3.2.2.8	Ensaio E	97
3.2.3.	Tratamento Estatístico	98
4.	RESULTADOS E DISCUSSAO	100
4.1	Composição centesimal	100
4.2	Ensaio de balanço de nitrogênio	100
4.3	Experimentos com aminoácidos marcados com trí- tio	119
4.4	Experimentos com nucleosídeos	139
4.4.1	Ensaio com [G- ³ H]-adenosina	139
4.4.2	Ensaio com [G- ³ H]-uridina	145
5.	CONCLUSOES	149
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	151

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Regressão linear para a relação entre a variação de peso (g) e nitrogênio retido (mg), em ratos Wistar previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados respectivamente com 50 μ Ci de ^3H -arginina, 42 μ Ci de ^3H -glicina, 45 μ Ci de ^3H -leucina e 50 μ Ci de ^3H -adenosina após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3, e aprotéica 114
- FIGURA 2. Regressão linear para a relação entre radioatividade das fezes (μ Ci) e nitrogênio fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μ Ci de ^3H -Arg, após balanço de 4 dias em dietas de caseína e feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e aprotéica 122
- FIGURA 3. Regressão linear para a relação entre radioatividade das fezes (μ Ci) e nitrogênio fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 42 μ Ci de ^3H -Gly, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e aprotéica 123

FIGURA 4. Regressão linear para a relação entre radioatividade das fezes (μCi) e nitrogênio fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 45 μCi de ^3H -Leu, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e aprotéica 124

FIGURA 5. Regressão linear para a relação entre digestibilidade aparente (%) e nitrogênio endógeno fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μCi de ^3H -Arg, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3 131

FIGURA 6. Regressão linear para a relação entre digestibilidade aparente (%) e nitrogênio endógeno fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 42 μCi de ^3H -Gly, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3 132

- FIGURA 7. Regressão linear para a relação entre digestibilidade aparente (%) e nitrogênio endógeno fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 45 μ Ci de ^3H -Leu, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3 133
- FIGURA 8. Radioautografia do jejuno de ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, após 24 horas de injeção de 50 μ Ci de ^3H -Arg e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) e cv. Carioca 80 (a) e caseína (b), como fontes protéicas 135
- FIGURA 9. Radioautografia de jejuno de ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dieta, após 24 horas (a) 48 horas (b) e 72 horas (c) de injeção de 45 μ Ci de ^3H -Leu e colocados em dieta contendo feijão cv. Carioca 80 como fonte protéica 136

FIGURA 10. Radioautografia de jejuno de ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, após 96 horas de injeção de 50 μ Ci de 3 H-adenosina e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 (a), caseína (b), como fontes protéicas, e aprotéica (c) 142

FIGURA 11. Regressão linear para a relação entre radioatividade das fezes (μ Ci) e RNA (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μ Ci de 3 H-adenosina, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e aprotéica 143

FIGURA 12. Radioautografia de jejuno de ratos Wistar, em dietas de caseína após 2 horas (a), 6 horas (b) e 12 horas (c) de injeção de 120 μ Ci de 3 H-uridina e em dieta de feijão após 2 horas; (d); os ratos foram previamente jejuados e adaptados às dietas 147

INDICE DE TABELAS

TABELA 1.	Formulação das dietas utilizadas nos ensaios biológicos, segundo AOAC (1975)	91
TABELA 2.	Formulação da mistura salina utilizada nos ensaios biológicos, segundo AOAC (1975)	92
TABELA 3.	Formulação da mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos, segundo NBC (1978) ..	93
TABELA 4.	Composição centesimal (g/100g) da farinha integral de feijão, cultivares Carioca 80 e Aeté 3	101
TABELA 5.	Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μ Ci de 3 H-Arg e colocados em dietas contendo feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados	102

TABELA 6. Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 42 μCi de $^3\text{H-Gly}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados 103

TABELA 7. Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 45 μCi de $^3\text{H-leu}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados 104

TABELA 8. Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μCi de $^3\text{H-adenosina}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados 105

TABELA 9. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, valores biológicos aparentes e verdadeiros, em ratos Wistar previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μCi de $^3\text{H-Arg}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados 110

TABELA 10. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, valores biológicos aparentes e verdadeiros, em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 42 μCi de $^3\text{H-Gly}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados 111

TABELA 11. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, valores biológicos aparentes e verdadeiros, em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 45 μCi de $^3\text{H-Leu}$ e colocados em

dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéicas, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados 112

TABELA 12. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, valores biológicos aparentes e verdadeiros, em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μ Ci de ^3H -adenosina e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéicas, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados 113

TABELA 13. Radioatividade de fezes e urinas, nitrogênio endógeno fecal e digestibilidade real em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μ Ci de ^3H -Arg e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, ao fim de balanço de 4 dias 126

TABELA 14. Radioatividade de fezes e urinas, nitrogênio endógeno fecal e digestibilidade real em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 42 μCi de $^3\text{H-Gly}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, ao fim de balanço de 4 dias 127

TABELA 15. Radioatividade de fezes e urinas, nitrogênio endógeno fecal e digestibilidade real em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 45 μCi de $^3\text{H-Leu}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas, ao fim de balanço, de 4 dias 128

TABELA 16. Radioatividade, em diferentes tempo, do conteúdo do intestino grosso em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μCi de $^3\text{H-Arg}$ e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e caseína, como fontes protéicas 137

TABELA 17. Radioatividade, em diferentes tempos, do conteúdo do intestino delgado em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μCi de ^3H -Arg ou 45 μCi de ^3H -Leu e colocados em dietas contendo feijão cv. Carioca 80 e caseína, como fontes proteicas 138

TABELA 18. Radioatividade de fezes, conteúdo do intestino grosso, urinas e intestino delgado e RNA fecal em ratos Wistar previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μCi de ^3H -adenosina e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e caseína, como fontes protéicas, e aprotéicas, ao fim de balanço de 4 dias 141

TABELA 19. Radioatividade do intestino delgado em ratos Wistar, mantidos durante 15 dias e injetados com 120 μCi de ^3H -uridina, para dietas contendo (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e caseína, como fontes protéicas, às 2 horas, 6 horas e 12 horas 146

RESUMO

A presente tese teve como objetivo verificar a influência do feijão (*Phaseolus vulgaris*) cozido, como fonte proteica, na quantidade de nitrogênio endógeno fecal de ratos Wistar, como também estabelecer a origem deste material através da marcação de proteínas e ácidos nucleicos dos ratos, respectivamente, com ^3H -aminoácidos e ^3H -nucleosídeos.

Realizou-se três ensaios de balanço de nitrogênio em ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados à dieta, adrede marcados em suas proteínas mediante injeção intraperitoneal de L-[5- ^3H]-arginina-monocloridrato, [2- ^3H]-glicina ou DL-[4,5- ^3H]-leucina, em dose única de 42-45 μCi por rato, e colocados em dietas de feijão cv. Carioca 80, feijão cv. Aeté 3 ou caseína, com teor protéico de 10% e aprotéica. Isto permitiu comparar as excreções endógenas de nitrogênio fecal e urinário dos ratos nas diversas dietas balanceadas utilizadas. Visando uma análise mais confiável e como um monitoramento fez-se determinação da dieta consumida, variação de peso dos animais e sua correlação com o nitrogênio retido, a digestibilidade e o valor biológico das proteínas. Observou-se que o consumo do grupo em dieta de caseína era significativamente ($p < 0,05$) maior do que o consumo dos grupos em dieta de feijão. O consumo de alimento pelos grupos em dieta de feijão não chegou a ser diferente, em dois experimentos, daquele dos ratos em dieta aprotéica. As correlações entre variação de peso e nitrogênio retido foram expressas por regressão linear positiva ($r = 0,83309$, $p < 0,0001$). O nitrogênio fecal total excretado pelos grupos em

dieta de feijão foi significativamente ($p < 0,05$) maior, chegando de 2,6 a 4,1 vezes maior do que o excretado pelos ratos em dieta de caseína.

Para comparar a excreção endógena fecal dos ratos em dietas teste com aqueles em dieta controle de caseína e aprotéica, determinou-se a radioatividade nas fezes dos ratos. Observou-se que o grupo em dieta Carioca 80 excretou quantidade significativamente ($p < 0,05$) maior de radioatividade do que aqueles em dietas de caseína e aprotéica. Para o grupo em dieta Aeté 3, a radioatividade das fezes foi maior em relação à aprotéica, mas nem sempre diferiu daquela dos ratos em dieta de caseína. A quantificação de nitrogênio fecal endógeno era estimada a partir da proporção do nitrogênio endógeno total e a radioatividade das fezes, com base na dieta aprotéica. As quantidades estimadas referente às dietas de cultivares de feijão, bem como as decorrentes da dieta aprotéica, demonstraram que os animais alimentados com feijão excretaram 133 a 166% mais nitrogênio endógeno.

A determinação da radioatividade do intestino delgado monitorado com radioautografia evidenciou uma maior incorporação de arginina do que leucina e glicina. Os coeficientes das correlações lineares positivas, obtidas entre a radioatividade das fezes e o nitrogênio fecal, $r = 0,8694$, $p < 0,001$; $r = 0,7708$, $p < 0,001$ e $r = 0,7212$, $p < 0,003$, respectivamente para ^3H -arginina, ^3H -leucina e ^3H -glicina, bem como o maior parâmetro B do modelo ajustado ($y = B_0 + Bx$), demonstraram que, no caso de arginina, a radioatividade que chega às fezes ligada ao nitrogênio é maior. Sendo assim,

considerou-se arginina como marcador protéico mais apropriado.

Tendo em vista estabelecer se o aumento da excreção de nitrogênio era devida à descamação dos enterócitos, realizou-se ensaio de balanço de nitrogênio, no qual os ratos foram previamente marcados em seus ácidos nucléicos mediante a injeção intraperitoneal de 50 μ Ci de [G- 3 H]-adenosina e colocados em dietas de feijão Carioca 80, caseína ou protéica. O conteúdo de RNA das fezes do grupo em dieta Carioca 80 era significativamente maior ($p < 0,05$) do que o do grupo em caseína; entretanto, o valor da radioatividade das fezes não apresentou diferença significativa com o grupo em caseína. A radioatividade mostrou-se significativamente mais incorporada no intestino delgado dos ratos em dieta do feijão, após 96 horas. Por outro lado, no ensaio realizado com [5- 3 H]-uridina, no qual os ratos mantidos durante 15 dias nas dietas de feijão Carioca 80 ou caseína, receberam injeção intraperitoneal de 120 μ Ci de [5- 3 H]-uridina, foi observado que a radioatividade do intestino delgado dos ratos em dieta de feijão, nos períodos de 2,4 e 6 horas, era maior do que a obtida para os ratos em dieta de caseína. Os resultados obtidos nos experimentos com nucleosídeos, confirmaram um metabolismo maior de nucleosídeos para ratos em dieta de feijão. O maior metabolismo de nucleosídeos no intestino delgado de ratos em dieta de feijão, foi considerado como indicativo de uma maior hipertrofia e/ou hiperplasia celular; entretanto, os resultados obtidos não mostraram evidência de um aumento significativo na descamação da mucosa intestinal.

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the influence of cooked beans as a source of protein, on the quantity of fecal endogenous nitrogen excretion and to explain the origins of this material in Wistar rats. To attain these objectives the technique of labelling protein and nucleic acid with ^3H -aminoacids and ^3H -nucleosides, respectively, was used.

Three experiments of nitrogen balance were carried out with Wistar rats. The animals were first subjected to fasting, followed by a period of adaptation to the diet before labelling their proteins with intraperitoneal injection of a 45 μCi dose of L-[5- ^3H]-arginine-monohydrochloride, [2- ^3H]-glycine or DL-[4,5- ^3H]-leucine. They were then fed on diets containing either bean (cv. Carioca 80), bean (cv. Aeté 3) or casein providing a total of 10% protein or a non-protein diet. These experiments permitted a comparison of the quantity of endogenous nitrogen excreted in the feces and urine of the rats on test diets and control diets.

To ensure the accuracy of the analysis, a simultaneous assessment of diet intake, correlation between the weight gain and retention of nitrogen, as well as the digestibility and biological value of the protein were also undertaken. Rats fed diets containing casein showed a significantly ($p < 0.05$) higher ingestion of diet, as compared with those on the bean diet. The correlations between the weight gain and the retention of nitrogen were expressed by positive and moderate linear regression ($r = 0.83309$, $p < 0.0001$). The

total fecal nitrogen excreted by the groups fed the bean diet were between 2.6 and 4.1 times more than that excreted by animals fed the casein diet.

In order to compare the quantity of endogenous nitrogen excreted in the feces and urine of rats on test diets and control diets, the radioactivity of the feces of rats fed on test diets and on control diets were determined. The rats fed on the diet containing Carioca 80 excreted significantly ($p < 0.05$) more radioactivity than animals on the casein diet. For those fed a diet containing Aeté 3 the excretion of radioactivity was significantly ($p < 0.05$) higher than for the groups fed a non-protein diet but not always higher than those fed a casein diet. The quantification of endogenous fecal nitrogen in both cultivars of bean and of non-protein diet demonstrated that the animals fed the bean diet excreted higher levels (133 to 166%). Endogenous nitrogen excretion of rats was estimated by the ratio of total endogenous nitrogen to marker nitrogen, based on the protein-free diet.

The determination of radioactivity in the small intestine monitored with radioautography indicated a larger incorporation of arginine than leucine. The coefficients of the positive and moderated linear regression obtained between radioactivity of feces and fecal nitrogen $r = 0.8694$, $p < 0.001$; $r = 0.7708$, $p < 0.001$ and $r = 0.7212$, $p < 0.003$, respectively for ^3H -arginine, ^3H -leucine and ^3H -glycine, together with the larger B parameter of the adjusted model ($y = B_0 + Bx$) demonstrated that the levels of radioactivity appearing in the feces combined with nitrogen

were higher in the case of arginine, as compared to leucine and glycine, thus indicating arginine as the most appropriate protein labeller.

In order to establish if the increased fecal secretion of nitrogen by rats fed on a diet containing bean was due to an enhancement of proliferation and loss of enterocytes, a nitrogen balance was carried out in which the rats were labelled with intraperitoneal injection of 50 μ Ci doses of [G- 3 H]-adenosine and then put on the Carioca 80 diet, casein diet or non-protein diet. Comparing the group on the Carioca 80 diet to the casein group, the quantity of RNA in the feces was significantly ($p < 0.05$) larger, but the radioactivity level of the feces, although somewhat higher, was not shown to be statistically significant ($p < 0.05$). The radioactivity was significantly more incorporated in the small intestine of rats fed on a bean diet after 96 hours. Another experiment was carried out with [3 H-5]-uridine in which the rats were kept for a period of 15 days on bean (cv. Carioca 80) or casein diet and immediately after received an intraperitoneal injection of 120 μ Ci [5- 3 H]-uridine. This demonstrated that the radioactivity was higher in the small intestines of the bean-fed rats than in the casein-fed rats, over periods of 2, 4 and 6 hours.

The results obtained from the nucleoside experiments indicated elevated metabolism of the nucleosides by the small intestines of bean-fed rats. This increase in metabolism provided evidence of increased cellular proliferation. However the results provide no evidence of increased loss of intestinal mucosal cells.

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) representa uma fonte rica de proteína em termos quantitativos, podendo variar entre 18 a 35%. Dada a alta ingestão diária deste grão em várias populações, chegando a 66 gramas por dia "per capita" pelo povo brasileiro (Food and Agricultural Organization, FAO, 1971), fica claro a sua importância.

O valor nutricional das proteínas de feijão, mesmo após cozimento, é limitado por vários fatores, entre outros, a grande quantidade de nitrogênio excretado nas fezes, 2 a 3 vezes maior que o excretado pelo consumo de caseína, resultando valores baixos para indicadores de qualidade protéica. O aumento na excreção de nitrogênio fecal foi atribuído à resistência de proteínas de feijão à hidrólise enzimática, à presença de fatores antinutricionais, tais como os inibidores das proteases, lectinas e compostos fenólicos e a outros constituintes do feijão, como carboidratos e fibras.

O efeito destes fatores no aumento de excreção de nitrogênio fecal, no caso do feijão cru, está relativamente esclarecido. Entretanto, no caso de feijão cozido, o mecanismo de ação é menos elucidado, pois foi mostrado repetidamente que após tratamento térmico, as proteínas isoladas de feijão tornam-se digeríveis e os fatores antinutricionais não foram detectados neste. Contudo, estes fatores de uma

maneira ou de outra foram considerados responsáveis pelo aumento de nitrogênio fecal, seja de fonte exógena, nitrogênio ingerido da dieta, ou endógena, tanto nitrogênio originário de secreção quanto do epitélio intestinal e ainda nitrogênio procedente da flora bacteriana do intestino.

As evidências de aumento de nitrogênio endógeno foram demonstradas por diferentes autores (Shurpalekar et alii, 1979; Bender e Mohammadiah, 1981; Fairweather-Tait, 1983; Bergner et alii, 1984; Durigan 1985; Oliveira e Sgarbieri, 1986a; Lanfer Marques e Lajolo, 1988).

Embora haja concordância entre os citados autores no que se refere ao incremento da secreção e da excreção do nitrogênio endógeno devido à ingestão de feijão, não existe, no entanto, um consenso com relação à quantidade e à fonte deste nitrogênio, assim como qual a contribuição das secreções digestivas e da descamação epitelial para a mistura nitrogenada intestinal e fecal. Estes dados podem ter importância nutricional e implicações fisiológicas.

Visando obter maiores informações sobre o aumento da quantidade do nitrogênio endógeno fecal em ratos alimentados com feijão cozido, como fonte protéica, em relação àqueles em dietas controles, caseína e aprotéica e, bem como, sobre a fonte desse nitrogênio, é que este trabalho foi conduzido. Para tal, realizou-se ensaios de balanço de nitrogênio com ratos marcados em suas proteínas com aminoácidos tritiados e

posterior determinação da radioatividade das fezes, diferenciando assim a fonte de nitrogênio endógeno do exógeno. Com vistas a tentar estabelecer se o aumento de excreção endógena de nitrogênio era devida à descamação dos enterócitos, os ratos foram marcados em seus ácidos nucléicos com nucleosídeos tritiados e posterior determinação de RNA, contagem da radioatividade nas fezes e amostras do intestino delgado. Paralelamente, realizou-se monitoramento com radioautografia.

2. REVISAO DA LITERATURA

2.1 Secreção e excreção de nitrogênio endógeno em mamíferos

Vários trabalhos foram feitos para estimar a extensão pela qual a proteína da dieta é diluída com proteína endógena, tanto devido às secreções como devido à descamação do epitélio, durante a digestão e absorção. Nasset (1957), sugeriu a hipótese de que o nitrogênio endógeno, secretado, digerido e absorvido, pode ter significância homeostática e nutricional. Nasset e Ju (1961) através de jejunostomia, alimentaram cães com caseína radioativa ^{14}C , como única fonte de proteína, e mediram a radioatividade do conteúdo do jejuno, quatro vezes durante 10 horas. De acordo com seus cálculos, o nitrogênio da caseína marcada havia diluído de 4 a 6 vezes com o nitrogênio endógeno. Por outro lado, quando alimentaram ratos com a dieta teste, através de jejunostomia, observaram que o nitrogênio da dieta havia diluído de 6 a 7 vezes. Gilter (1964) analisando os experimentos de Nasset e Ju com ratos, observou que, no período de duas horas, 49,7 mg de nitrogênio de caseína marcada havia sido esvaziado do estômago e a quantidade recuperada no conteúdo do intestino delgado foi de 2,9 mg. Sendo assim, 46,6 mg de nitrogênio da caseína da dieta tinha desaparecido do trato gastro-intestinal e não havia quase nenhuma acumulação de

caseína. Porém, a quantidade de nitrogênio endógeno digerido e absorvido, durante este período, não era conhecida. Gilter (1964) levanta a questão: será que a velocidade de digestão e absorção para o nitrogênio endógeno e exógeno é a mesma? O autor cita evidências para mostrar que proteínas endógenas são digeridas mais lentamente que a proteína da dieta. Nasset e colaboradores (1973) relataram que, normalmente, enzimas digestivas parecem ser hidrolizadas no intestino delgado. Snook e Meyer (1964) inferiram que a presença de proteína da dieta, no duodeno e jejuno, parece retardar a desativação das enzimas digestivas. Zebrowska e colaboradores (1976) mostraram evidências de que os aminoácidos endógenos tendem a acumular-se no íleo terminal. Asche e colaboradores (1989) relataram que a maior parte das enzimas digestivas eram hidrolizadas rapidamente, pois apenas poucas proteínas solúveis, com peso molecular correspondente ao das enzimas pancreáticas (20.000 a 50.000), foram detectadas no intestino. Os autores encontraram no conteúdo do estômago e do intestino de porcos alimentados com soja (22% de proteína), respectivamente, 80% e 65% de proteínas solúveis de peso molecular entre 2.000 e 15.000 D.

Holmes e colaboradores (1974) estudaram a digestão de proteínas no intestino delgado e grosso de porcos alimentados com dietas contendo, como fonte protéica, soja ou

colza, ou ainda sem proteína. Encontraram uma diferença significativa na concentração de aminoácidos no íleo e nas fezes. Os autores afirmam que a secreção de proteína endógena não mascarava a diferença existente entre as dietas, como foi afirmado anteriormente por Nasset e Ju (1961). Foi considerado (Protein, 1979), baseado no trabalho de Badawy e colaboradores (1957), que o modo de sacrifício dos animais forneceria uma explicação para as secreções massivas ocorridas nos experimentos de Nasset e Ju (1961), já referido. Segundo Badawy e colaboradores (1957), o modo usual de sacrifício de carneiros causa uma grande descamação da mucosa no intestino. Esta descamação é evitada se a remoção de segmentos do intestino for feita após anestesia com barbitúricos. Resultados semelhantes foram obtidos para os ratos.

Twombly e Meyer (1961) e Snook (1965) estimaram a quantidade secretada de nitrogênio endógeno através da determinação da relação entre o óxido crômico, como marcador, e o nitrogênio existente no conteúdo intestinal e fecal dos ratos. Verificaram que a quantidade de nitrogênio endógeno secretado no intestino durante o período de 12 horas de digestão foi de 70 mg e 125 mg, respectivamente, para ratos em dieta aprotéica e para os alimentados com dieta contendo 15% de proteína de ovo. O valor de 125 mg de nitrogênio endógeno foi quase igual à quantidade da proteína da dieta consumida.

Low (1979) determina, pelo método aprotéico, uma quantidade de 5 a 7 g de nitrogênio endógeno excretado nas fezes por dia, em porcos, isto é, quase 15% da quantidade de nitrogênio consumido pelo animal numa dieta com 18,4% de caseína. Corring (1975) relata que 3 a 4 g/dia de nitrogênio endógeno (equivalente a 11% de nitrogênio da dieta consumida) é secretada pelo pâncreas do porco com 45 Kg de peso. Horszczaruk e colaboradores (1974) estimaram o valor de 10-22 g/dia para o nitrogênio secretado no lúmen do intestino delgado de porcos.

Roger (1963), citado por Roger e Harper (1966), na tentativa de estudar os fatores que influíam na quantidade e na fonte da proteína endógena secretada no intestino delgado e excretado nas fezes, alimentou ratos com proteínas hidrolisadas de (U-¹⁴C) algáceo. Os animais estavam em dietas contendo 0, 15, 45 ou 75% de caseína. Medindo a radioatividade das fezes, observou que a quantidade de radioatividade no material fecal foi igual para todos os grupos, independente do nível de proteína da dieta, o que, para os autores, foi inesperado, uma vez que a radioatividade devia ter sido mais diluída devido ao maior nível da proteína. Os resultados obtidos quando o isótopo foi injetado em vez de administrado por via oral mostraram uma radioatividade consideravelmente mais alta em fezes de ratos que recebiam dieta com

maior quantidade de caseína. Havia, aparentemente, uma circulação maior de radioatividade no lúmen do trato intestinal. Isto indicava um índice de "turnover" mais rápido e um aumento da secreção digestiva como resultado do alto nível de proteína.

Foi observado que um aumento na quantidade de polissacarídeos da dieta humana causa um aumento significativo na perda de nitrogênio fecal e foi sugerido que o mesmo é derivado de fonte endógena (Southgate & Durnin, 1970; Walker, 1975). Meyer (1956), verificou que numa dieta de 15 a 30% de celulose não ocorreu nenhuma mudança significativa no nitrogênio endógeno, enquanto que a excreção do nitrogênio total aumentou significativamente. Este aumento de nitrogênio fecal foi observado por Harmuthe-Hoene e Sckwerdtfeger (1979) em ratos que recebiam dieta de caseína com 10% de polissacarídeos indigeríveis e por Nomani e colaboradores (1979), quando seis tipos de fibra foram adicionadas, a nível de 2,1%, à dieta de ratos. Os resultados destes autores não foram conclusivos sobre a fonte deste excesso de nitrogênio em fezes.

A interferência do nitrogênio endógeno fecal na determinação de valor protéico já era conhecida desde o início do século (Mitchell, 1923). O nitrogênio endógeno é originário de diversas fontes. A ingestão de qualquer refeição

desencadeia uma série de estímulos neurais, hormonais, químicos e mecânicos que excitam as células secretoras da saliva, do suco gástrico, do suco pancreático e do intestino para que secretem enzimas e outras proteínas no trato gastrointestinal. Kavanitsky, em 1951, citado por Low (1980), mediu, em porcos, a quantidade de secreções salivares em relação à idade e Low (1980) em relação à dieta e à água consumida. As evidências disponíveis não permitiram estimar a quantidade da saliva presente tanto no conteúdo gástrico como entérico. Secreções gástricas foram medidas em estômago isolado de porcos, mas a estimativa exata da quantidade total das secreções gástricas nestes animais não foi obtida quando alimentados normalmente. A pepsina gástrica do porco foi estudada detalhadamente do ponto de vista bioquímico, mas uma estimativa segura da quantidade da secreção não pode ser determinada (Low, 1980). As secreções do sistema biliar e do pancreas, bem como a esfoliação das células epiteliais da mucosa intestinal, outra significativa fonte de nitrogênio endógeno (Nasset & Ju, 1961), serão abordados em separado.

2.1.1 Sais biliares

Numa série de estudos do sistema biliar em ratos, Norman e Sjoval (1958) mostraram que a maior quantidade de

ácidos biliares está presente no conteúdo do intestino delgado e ceco. O fígado e a parede intestinal contavam com 3 a 9 por cento deste total. Inferiram ainda que ácidos biliares são absorvidos no intestino delgado e, em menor quantidade e velocidade, no ceco. Os próprios autores observaram que na bile o ácido cólico é conjugado com taurina e glicina; para isso, administraram ácido cólico marcado em ratos e analisaram a radioatividade do ácido biliar em diferentes partes do trato intestinal. No intestino delgado, o ácido biliar ainda estava conjugado, especialmente com taurina, enquanto no ceco as ligações peptídicas sofreram desconjugações devido à ação de microorganismos tais como clostrídios e enterococos e foram excretado nas fezes como diferentes metabólitos.

Mahafouz e colaboradores (1984) e Villalon e colaboradores (1987) mostraram que a proteína da dieta influencia a composição da bile. A porcentagem dos ácidos quenodesoxicólico e desoxicólico aumentaram significativamente em dieta de baixo teor protéico, enquanto a do ácido cólico diminuiu. Rodriguez e colaboradores (1983) ao estudarem a relação de quantidade de proteína ingerida e a formação de bile, mostraram que a dieta aprotéica diminui o fluxo de bile. Villalon e colaboradores (1987) estudaram o efeito da dieta com baixo teor protéico sobre o fluxo da bile, lipídios biliares e secreções protéicas em ratos. Observaram que animais alimentados com dieta de 8% de proteína

por 4, 8 e 12 semanas tinham um fluxo menor da bile, ácidos biliares e índice de secreção de proteína, quando comparados com ratos alimentados com dietas de 26% de proteína. Fisher e colaboradores (1975) estudaram o pool de ácidos biliares em ratos, determinando o conteúdo de ácidos biliares do trato intestinal, sangue e fígado dos animais machos e fêmeas sob várias dietas. O pool total de ácidos biliares foi de quase 100 μ moles/100 g de peso corporal, nos animais alimentados com dieta comercial (Purina Chow) e de 60 moles/100 g de peso corporal, em ratos alimentados com dieta semi-sintética. Deste pool de ácidos biliares, 97% estava localizado no trato intestinal, não dependendo do sexo e da dieta. Os autores afirmaram que os resultados de seus estudos podem ser aplicados com confiança somente nas suas condições experimentais, enfatizando que o pool de ácidos biliares pode variar com a idade, o sexo, o tamanho, a linhagem e a dieta, em outras condições experimentais (sic).

Boyd e Eastwood (1968) estudaram a distribuição quantitativa de sais biliares ao longo do intestino delgado de ratos, variando a dieta em relação a polissacarídeos. A quantidade de triglicerídeos não afetou a quantidade de sais biliares, mas a adição de polissacarídeos à dieta ocasionou um grande aumento nos sais biliares do intestino. A concentração maior de sais biliares do intestino encontra-se no íleo, por ser a região mais ativa na absorção destes sais.

Schneeman e Gallaher (1980) alimentaram ratos com dieta sem fibra ou com 20% de celulose por 10 dias e observaram que a fibra da dieta pode afetar a disponibilidade dos ácidos biliares no intestino delgado. Sheard e Schneeman (1980) alimentaram ratos com dieta controle, sem fibra, ou dieta contendo 5% de farelo de trigo. Observaram que após 10 dias de alimentação não houve nenhuma diferença no nível de ácidos biliares no intestino delgado. Eastwood e Hamilton (1968) mostram que constituintes das fibras vegetais são capazes de se ligar aos sais biliares e ácidos biliares. A lignina foi a fração responsável por esta quelação. Foi sugerido por Norman (1964) que a bile não absorvida pelo intestino delgado, ao chegar ao intestino grosso, é absorvida por microorganismos. Ide e Harii (1989) analisaram ácidos biliares na bile e no lúmen de ratos que foram alimentados com dieta sem fibra, ou dieta contendo celulose ou ainda pectina em níveis de 100 g/kg de dieta. A dieta com pectina aumentou a secreção e excreção de sais biliares no lúmen e nas fezes, em relação à dieta sem fibra, o que não ocorreu em relação à dieta com celulose. Os autores investigaram ainda, o efeito da dieta, com ou sem fibra, sobre a conjugação de ácidos biliares com glicina e taurina. Eles relatam que nas dietas sem fibra a relação entre ácidos conjugados com glicina e taurina era 0,2. Este valor passou para 4 em ratos alimentados com dieta que continha pectina, como fonte de fibra. Estudo do efeito de carboidratos na dieta com baixo teor de

digestibilidade sobre bactérias modificadoras de ácidos biliares mostraram resultados variáveis: farelo de trigo e celulose reduziram a proporção de ácido desoxicólico na bile humana (Nomani et alii, 1986), enquanto com a pectina ocorreu o efeito reverso (Hillman et alii, 1986). De acordo com Hillman op. cit., o farelo não modificou a transformação bacteriana da bile em ratos, enquanto o amido de milho a diminuiu.

2.1.2 Secreções pancreática

O pâncreas é um dos órgãos mais ativos do corpo. Secreta uma quantidade grande de bicarbonato, água e enzimas digestivas. Sob uma circunstâncias normais, ocorre a secreção de aproximadamente 20 proteínas, regularizada pelas influências neural e hormonal (Palade 1975, Geokas 1984). O conceito de que uma refeição simples influe na composição de enzimas pancreáticas foi levantado por Paul Low em 1910, citado por Keim (1986). Grossman e colaboradores (1942) foram os primeiros a mostrar diretamente a adaptação de enzimas pancreáticas em dietas ricas em proteína e amido. Mais tarde, numerosos investigadores mostraram que não somente estocagem de enzimas em grânulos de zimogênio, mas também a síntese e a secreção, dependiam da composição da dieta administrada (Grossman et alii, 1944; Snook, 1965; Rebound et

alii, 1966). A modificação, induzida pela dieta, na composição das enzimas, dos tecidos e do pâncreas e a sua secreção é conhecida como adaptação pancreática à dieta e foi descrita em muitas espécies (Poort & Poort, 1980). A capacidade das células acinares para alterar a composição de enzimas, em resposta à mudança da composição da dieta, foi demonstrada por Grossman e colaboradores (1944) e Howard e Judkin (1963). A síntese e atividade de amilase do pâncreas são aumentadas com dieta rica em carboidrato, enquanto protease é aumentada com dieta rica em proteína (Dagorn & Mongeau, 1977; Johnson et alii, 1977; Dagorn & Lahaie, 1981; Stockmann & Soling, 1981). Dubick e colaboradores (1988) estudaram a resposta pancreática de ratos à dieta contendo 8,5%, 24% e 40% de proteína, após adaptação, mostrando que, atividades da tripsina e da quimotripsina eram significativamente maiores nos pâncreas dos ratos adaptados à dieta 40% do que à dieta com 8,5% de proteína. Esta mudança no conteúdo enzimático do pâncreas não era refletida no plasma. A atividade da tripsina foi correlacionada com o conteúdo da proteína da dieta, assim, a atividade desta enzima no grupo em dieta com 40%, foi 133% maior do que aquela do grupo em dieta com 8,5%. Não houve diferença significativa na atividade de quimotripsina entre pâncreas de ratos alimentados com dieta contendo 24% e 8,5% de proteína, enquanto que a atividade em grupo em dieta com 40% foi 138% maior do que a do grupo 8,5%. As células acinares isoladas do pâncreas dos

ratos do grupo alimentado com 8,5% de proteína, mostraram uma resposta significativamente reduzida à colecistoquinina e secretina, na liberação da enzima, quando comparada com os outros grupos.

Autores como Rebound e colaboradores (1966) afirmam que a completa adaptação do pâncreas à dieta ocorre após 5 a 20 dias, enquanto, segundo outros autores (Adelson & Rothman, 1975; Rothman, 1976; Rothman & Willeing, 1978; Tseng et alii, 1982), esta adaptação pode ocorrer dentro de alguns minutos e isto pode significar que as enzimas armazenadas foram liberadas em resposta à dieta consumida. Esta adaptação rápida foi chamada "secreção não paralela" e foi observada após aplicação de diferentes secretagogos (Rothman, 1976; Rothman & Willeing, 1978). Enquanto os referidos autores encontraram rápida adaptação, outros (Steer & Glazer, 1976; Steer & Manabe, 1979) não a observaram. Keim (1986) descreve um modelo experimental que permite medir, em ratos conscientes, secreções pancreáticas basal e estimulada. Os animais foram alimentados com 3 dietas diferentes por 14 dias. No suco pancreático basal (sem estímulo), a quantidade de protease e amilase variou de acordo com a composição da dieta administrada. Dependendo do estímulo, o volume do suco e secreção de proteína e bicarbonato aumentou entre 20 a 50 minutos. A quantidade de proteína secretada no suco pancreático após o estímulo foi determinada e nenhuma

mudança significativa foi observada na composição da enzima secretada, independente da dieta administrada ou do estímulo recebido. O autor não conclui que tenha ocorrido "secreção não paralela" de enzima pancreática em ratos conscientes. Dagorn (1978), em experimentos com ratos conscientes, encontra uma "secreção não paralela" quando o índice de proteína da secreção basal é abaixo de 3 mg/h. Como os valores de proteínas secretadas em condição basal, encontrados por Keim (1986), eram 70% mais baixo que os valores obtidos por Dagorn, foi sugerido por Keim que talvez o fenômeno de "secreção não paralela" pode existir sob condição menos fisiológica ou sob condição ainda não conhecida.

Dagorn e Lahaie (1981), estudaram a ação reguladora da dieta sobre a síntese e concentração da proteína do pâncreas. Os ratos foram adaptados a uma dieta rica em carboidrato ou rica em proteína e depois foram colocados no regime oposto. A evolução do índice da síntese de amilase e quimotripsinogênio foram acompanhadas pela injeção intraperitoneal de ^3H -fenilalanina, 10 minutos antes do sacrifício. A porcentagem da incorporação de ^3H -fenilalanina em cada enzima individual, em relação à proteína total, foi chamada índice relativo da síntese. A mudança adaptativa no índice relativo da síntese da amilase e quimotripsinogênio foi observada 2 horas após o começo da nova dieta. Conclui-se que o índice relativo da síntese destas enzimas no pâncreas pode

ser rapidamente e, especificamente, regulado pela dieta. Esta adaptação à síntese da proteína que antecede à secreção resulta em mudança no nível de enzima interpancreática e conseqüentemente em secreção exócrina. Lahaie e Dagorn (1981) através da mesma técnica citada no experimento anterior, observaram que com 24 horas, o quimotripsinogênio e tripsinogênio, são respectivamente 70% e 50% maior do que no controle, e a amilase é 25% menor. Após 5 dias, a síntese das três enzimas chega a um valor determinado para cada dieta consumida. Para a dieta rica em proteína, o valor de quimotripsinogênio é três vezes maior, o de tripsinogênio é 2 vezes maior e o da amilase é 50% menor do que na dieta rica em carboidrato. O índice relativo da síntese da amilase e quimotripsinogênio demonstrou que 61% do processo adaptativo é completado com 24 horas e que os 40% restantes após 4 dias. Assim, com 5 dias a adaptação é completa.

Green e colaboradores (1986) estudaram em ratos a relação entre a dieta consumida, colecistoquinina (CCK) do plasma e o crescimento do pâncreas. Os animais adaptados à dieta controle (5% de caseína) foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo foi colocado em dieta com alto teor de proteína e o segundo grupo em dieta com baixo teor de proteína, durante duas semanas. Os animais foram sacrificados em 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, sete dias ou 14 dias após a adap-

tação à dieta. A CCK das células acinares, isoladas do pâncreas e do plasma, aumentou três vezes em ratos alimentados com alto teor de proteínas, após 24 horas. A elevação do nível de CCK voltou ao valor do controle em 7 dias. Os resultados indicaram que dietas com alto teor protéico inicialmente aumentam a liberação de CCK e a capacidade de secreção de protease do pâncreas e quando a secreção é suficiente para a digestão, o estímulo cessa, a secreção de CCK é regularizada e o nível de CCK do plasma retorna ao normal. Girard-Globa e colaboradores (1980) e Bourdel (1983), através dos resultados de seus experimentos, concluíram que o valor absoluto da proteína que passa no duodeno não é determinante da adaptação pancreática, mas sim, a concentração de proteína no bolo alimentar. A concentração da proteína afeta tanto a amilase como o quimotripsinogênio.

Vários estudos foram realizados sobre o efeito da qualidade da proteína na secreção pancreática. Howard e Judkin (1963) estudaram em ratos, o efeito da qualidade da proteína sobre a atividade da amilase e tripsina. A substituição de caseína por caseína hidrolisada diminuiu a atividade da tripsina em torno de 20%, mas não afetou a amilase. Green e colaboradores (1973) estudaram em ratos, o efeito da caseína e caseína hidrolisada, através da infusão intergástrica e retorno contínuo de suco combinado, bile-pâncreas, ao intestino. Observaram que proteína intacta é um estimu-

lante mais potente para as secreções pancreáticas do que a correspondente proteína em forma hidrolisada ou em forma de mistura de aminoácidos. Schneeman e colaboradores (1977) inferiram que, em ratos, a resposta secretora de enzimas pancreáticas à infusão intragástrica de uma dieta contendo caseína é mais efetiva do que a que contém caseína hidrolisada e/ou mistura de aminoácidos e 5 a 6 vezes maior do que a infusão intragástrica de uma dieta aprotéica. De acordo com os referidos autores e outros (Grossman et alii, 1944; Howard & Judkin, 1963; Schneeman & Lyman, 1975; Johnson et alii, 1977), a estimulação do pâncreas para produção de protease parece ser dependente da presença da proteína intacta. Grossman e colaboradores (1944) e Schneeman e Lyman (1975) sugeriram que a proteína, através da formação de complexo com tripsina e quimotripsina livre, inibe a ação destas enzimas e ajuda a liberação de CCK. Neste esquema será requerido um fluxo aumentado das enzimas. Lewis e Williams (1990) no estudo da regulação da secreção da CCK em ratos conscientes, através da estimulação do duodeno, com perfusão de alimentos (caseína e caseína hidrolisada) ou infusão intravenosa de hormônio, ou ainda, agente neural, observaram que a proteína intacta e ácidos graxos são estimulantes alimentares no intestino e, conseqüentemente, ajudam na liberação de CCK. Green e Nasset (1983), através da infusão intragástrica da dieta e do retorno contínuo do suco combinado, pâncreas e bile, ao intestino, observam que a infusão de uma dieta de

caseína não acarreta em um estímulo maior de secreção pancreática do que o de uma dieta aprotéica. Meyer e Kelly (1976) estudaram o efeito de cinco proteínas intactas, gelatina, albumina de ovo, caseína, hemoglobina e albumina de soro bovino sobre as secreções pancreáticas. Concluíram que a proteína intacta, quando injetada no intestino, tem somente um efeito muito pequeno na secreção do pâncreas. Em contraste, a ingestão destas proteínas foram potentes estimulantes para o pâncreas, exceto no caso da gelatina. O efeito da estimulação foi igual para todas as outras proteínas. Concluíram que o produto da hidrólise da proteína é que regula a resposta pancreática.

A ação de aminoácidos, individualmente, sobre o pâncreas foi estudada por Wang e Grossman (1951), Meyer e colaboradores (1971) e Konturek e colaboradores (1973). Pelos resultados apresentados por estes autores, podemos concluir que não há uma concordância sobre a idéia de quais são os aminoácidos estimulantes; mas fenilalanina e triptofano foram sempre afirmados como sendo os mais potentes. Ainda há a idéia de Johnson e colaboradores (1977) que afirmam que os aminoácidos não têm papel importante na adaptação do pâncreas à dieta rica em proteína. Meyer e Kelly (1976) administraram uma mistura de dois ou mais aminoácidos e verificaram que a potência da mistura parece estar relacionada com a potência de seus aminoácidos, mas não foi afirmado, com

certeza, se seria um efeito aditivo. Os autores relatam que, além de aminoácidos, outros produtos da digestão das proteínas, como peptídios, podem ser estimulantes da secreção pancreática; sendo assim estudaram o efeito de oligopeptídeos em cães. Peptídeos sintetizados comercialmente foram administrados nos duodenos dos animais, enquanto recebiam a injeção intravenosa de secretina. Entre os peptídeos testados, somente o glicilfenilalanina e gliciltriptofano estimularam as secreções do pâncreas, enquanto di e triglicina não tiveram efeito. Concluíram que alguns, mas não todos, oligopeptídeos, no intestino, são estimulantes das secreções pancreáticas.

O mecanismo de resposta do pâncreas ao inibidor da tripsina foi estudado por vários autores. Green e Lyman (1972) observaram que a presença de tripsina, quimotripsina e suco bile-pâncreas no intestino de ratos anestesiados, suprime a secreção pancreática. A remoção da atividade proteolítica do intestino, por desvio de suco bile-pâncreas ou por infusão de inibidor de tripsina no intestino, causa um grande aumento na secreção de enzimas pancreáticas. Foi sugerido que este "negative feedback control" é o mecanismo pelo qual o inibidor da tripsina pode induzir o pâncreas a uma secreção excessiva em ratos. O inibidor remove a atividade proteica do intestino pela formação do complexo enzima-inibidor com tripsina e quimotripsina do intestino. Sgarbieri e

Whitaker (1981) estudando as propriedades físico-químicas do inibidor da tripsina e quimotripsina de feijão (*Phaseolus vulgaris*) inferiram que o inibidor tem lisina no seu sítio de ligação com tripsina, o que sugere um mecanismo de ação competitiva para o inibidor da tripsina. Lyman e colaboradores (1962) relataram que a inativação de inibidor com tripsina cristalina, antes de ser administrada, não diminuiu a resposta do pâncreas. A atividade fisiológica desta substância parece estar associada com sua atividade e que a inativação da tripsina no intestino parece não ser necessária para a resposta pancreática. Os resultados não deixaram claro se a resposta pancreática foi iniciada pelo inibidor antes da formação do complexo com a tripsina do intestino, ou se a estimulação ocorreu como resultado desta combinação. Estudando a ação dos inibidores de proteases sobre tripsina e quimotripsina, usando o suco do intestino delgado humano e bovino, observaram que o inibidor do *Phaseolus vulgaris* inibe a tripsina humana menos do que a bovina (Belitz et alii, 1982).

Os estudos "in vitro" têm mostrado que certas fibras da dieta podem baixar a atividade da lipase, tripsina e quimotripsina (Schneeman, 1978). Schneeman e Gallaher (1980) estudaram a influência da celulose, num teor de 20% na dieta, e observaram que as atividades das enzimas no intestino delgado são afetadas, ocorrendo mudanças em sua composição.

Sheard e Schneeman (1980) alimentaram os ratos com dieta sem fibra ou dieta contendo 5% de farelo de trigo. Após 10 dias, a atividade total de lipase, amilase, tripsina e quimotripsina e a quantidade de proteína total aumentou nos tecidos do pâncreas. Não houve diferença na atividade destas enzimas no intestino. A substituição de 5% de carboidrato da dieta por farelo de trigo (adição de 0,7% de proteína e 0,3% de gordura) não foi suficiente para causar a modificação observada na composição das enzimas pancreáticas. Os autores acreditam que o farelo do trigo pode alterar as secreções pancreáticas ou a absorção dos produtos da digestão, permitindo uma mudança adaptativa do pâncreas.

2.1.3 Descamação do epitélio intestinal

No século dezoito, foi introduzido o conceito de renovação contínua do epitélio do trato gastro-intestinal (Leblond & Stevens, 1948). Desde então, os experimentos realizados em animais (Leblond & Messier, 1958; Creamer et alii, 1961) e no homem (MacDonald et alii, 1964) com precursores de ácidos nucléicos, especialmente timidina tritiada precursor de DNA (Leblond & Messier, 1958; Quastler & Sherman, 1959), mostraram que as células epiteliais são produzidas nas criptas da mucosa do intestino delgado, migrando ao topo da vilosidade, onde são descamadas. Jefferies e co-

laboradores (1962) e Nasset (1964) demonstraram que no trato gastrointestinal, a esfoliação das células epiteliais é uma fonte significativa da proteína endógena. Nasset (1965) mostrou que a descamação das células no intestino delgado do homem, resulta na liberação para o lúmen intestinal de 90 g de proteínas em 24 horas. A mucosa do intestino delgado é a superfície mais ativa do organismo (Croft & Lubran, 1965; Croft et alii, 1968). Loehry e colaboradores (1969) utilizaram a técnica de lavagem da superfície da mucosa intestinal e, através da determinação do ácido desoxirribonucléico (DNA), estimaram 20 a 50 milhões de células esfoliadas por minuto no lúmen do intestino delgado. Conrad e colaboradores (1964) estudaram em ratos, a descamação e a velocidade de migração das células epiteliais da cripta até o vilo, através da injeção intravenosa de 10 μ Ci de ^{59}Fe . O experimento baseou-se no fato de que o ^{59}Fe marca as novas células, formadas nas criptas, e a marcação continua nas células até chegarem ao topo do vilo, quando são descamadas. A determinação da radioatividade do lavado intestinal, em vários intervalos de tempo, mostrou no lúmen intestinal, duas fases distintas quanto à excreção de ferro injetado. Durante a primeira fase, logo após a injeção do isótopo, a radioatividade era máxima, decrescendo progressivamente até alcançar o valor constante, após 4 a 5 horas. Esta radioatividade não foi relacionada à descamação de células, pois este período apresentava o tempo que ^{59}Fe estava em alta concentração no

plasma. O segundo pico ocorreu entre 36 a 42 horas após a injeção, tempo correspondente ao "turnover" das células. O índice de migração demonstrado por Loehry e Croff (1969), através da injeção de timidina tritiada, foi de 36 a 46 horas.

Leblond e Messier (1958) e Pink e colaboradores (1970) determinaram que 80 a 85% das células do epitélio do intestino delgado são células absorptivas. McNurlan e colaboradores (1979) afirmaram que cerca de 14% das proteínas, no organismo do rato, são sintetizadas no intestino delgado. Southon e colaboradores (1985) atribuem provável relação entre o alto índice da síntese das proteínas e a rápida divisão celular que ocorre no intestino. Ainda sugerem que a síntese e a substituição de proteína em células em desenvolvimento e células maduras, junto com a produção de muco e outras proteínas secretoras, devem ser relacionadas com esse alto índice das sínteses das proteínas no intestino. Da Costa e colaboradores (1971), inicialmente, estudaram as proporções entre as proteínas e o DNA, como indicadores das perdas de células e proteínas no lavado intestinal dos ratos. O valor desta proporção foi significativamente grande. Em seguida, prepararam o isolado das células epiteliais viáveis do lavado e, novamente, determinaram a relação entre as proteínas e o DNA, obtendo um valor muito menor do que o inicial. Os cálculos mostraram que somente 8 a 15% das pro-

teínas eram provenientes do meio intracelular e outros 85 a 90% de fontes extra-celulares.

Moon e Joel (1975) observaram o efeito da idade do animal na descamação do epitélio de vilosidades, em intestino delgado de carneiros e cabras de várias idades (recém-nascidos até 3 meses), injetando timidina tritiada e usando a técnica de autorradiografia. Os dados indicaram que o tempo da esfoliação foi maior que 48 horas em animais recém-nascidos de ambas espécies, diminuindo significativamente com a idade; existia ainda uma grande diferença na localização das células epiteliais marcadas ao longo de vilos em animais de mesma idade, nas duas espécies.

A proliferação e migração das células no tecido epitelial do intestino são influenciadas por características do ambiente interluminal do intestino. A flora bacteriana é um componente significativo deste ambiente. Abrams e colaboradores (1963) através da comparação dos animais convencionais com os animais assépticos, demonstraram que o índice de "turnover" do epitélio intestinal nos animais assépticos foi significativamente mais baixo do que nos animais convencionais. Neste experimento, utilizou-se timidina tritiada como marcador, acompanhando-se por auto-radiografia. Vários outros investigadores, como Abrams e colaboradores (1963) e Matsuzawa e Silson (1965), observaram que a migração das cé-

lulas da mucosa das criptas para o topo dos vilos, em animais assépticos, ocorre em 4 dias, sendo duas vezes mais lento do que em ratos convencionais, que ocorre em 2 dias. De acordo com Gustafsson e colaboradores (1957), em ratos assépticos, praticamente o único ácido biliar formado, utilizado e excretado é o ácido taurocólico. Enquanto que, em ratos convencionais, o ácido taurocólico é hidrolisado no intestino pelas bactérias, em taurina e ácido cólico (Ranken et alii, 1971). Estes autores, baseado nos resultados de Gustafsson op. cit., estudaram o papel do ácido cólico na regulação do "turnover" das células da mucosa intestinal, na tentativa de explicar a diferença entre a velocidade da migração das células nos animais assépticos e convencionais. Nos seus estudos, os autores observaram que, quando o ácido cólico é adicionado à dieta dos ratos assépticos, o "turnover" das células da mucosa é reduzido de 4,44 para 2,12 dias, igualando com ratos convencionais.

Younosjai e colaboradores (1978) estudaram o efeito da dieta no crescimento da mucosa intestinal. Os seus resultados sugerem que o tipo de proteína (caseína ou soja), de carboidrato (dextrose e amido hidrolisado) e de óleo (mistura de óleo animal + vegetal, óleo de cereal ou toicinho) na dieta, não influem no crescimento da mucosa intestinal. Entretanto, a presença da fibra (mistura vegetal, aveia ou celulose) na dieta, aumenta o crescimento do intes-

tino delgado. O aumento parece ser maior em resposta à dieta com mistura de componentes vegetais e animais, que à dieta semi-purificada contendo aveia ou celulose. Ecknauer e colaboradores (1981) afirmaram que a proliferação das células e a morfologia das vilosidades são influenciadas pelos polissacarídeos que não são amidos. Tasman-Jones e colaboradores (1982) inferiram que o efeito dos componentes de fibra na determinação da estrutura e morfologia intestinal é uma ação aditiva de fibras sobre a bile, a composição e a função microbiana sobre a produção de polipeptídeos regulatórios. Entre todos os componentes da fibra de dieta, a pectina parece ter o efeito metabólico mais marcante. Southon e colaboradores (1985) alimentaram ratos Wistar com dieta comercial e dieta semi-sintética e através da técnica baseada na incorporação da L-[4-³H]-fenilalanina nos tecidos do intestino e do fígado, após a injeção intra-peritoneal do isótopo, determinaram o índice da divisão celular da mucosa e a síntese da proteína. Os valores obtidos eram maiores nos animais em dieta comercial. Os autores relatam que a razão deste aumento não está claro, mas pode estar relacionado à presença de polissacarídeo não absorvido, ou a outros materiais complexos da planta, existentes na dieta comercial, e que a adição de celulose fina à dieta livre da fibra não parece estimular a divisão celular da mucosa.

2.2 Aumento da excreção de nitrogênio em fezes de mamíferos, ocasionado pelo feijão, como fonte protéica

O nitrogênio excretado nas fezes é originário de quatro fontes: 1) nitrogênio não digerido da dieta; 2) nitrogênio originário de secreções digestivas; 3) nitrogênio proveniente da esfoliação do epitélio intestinal e 4) nitrogênio procedente da flora bacteriana do intestino.

Rosalesarzu (1972) mostrou que o nitrogênio fecal de crianças alimentadas com 236 mg de nitrogênio de leite/Kg de peso foi 19% do nitrogênio consumido, enquanto que para crianças alimentadas com feijão, 227 mg N/Kg de peso, este valor passou para 36% do nitrogênio consumido.

Bressani (1973) ao alimentar crianças com dieta contendo 100%, 25% e 0% de leite, completando a dieta com milho e feijão, observou que a quantidade de nitrogênio fecal passou de 18,1% para 36,3% do nitrogênio consumido à medida em que a percentagem de feijão + milho na dieta passou de 0% para 100%. Todo este efeito não pode ser atribuído ao feijão, pois a dieta foi completada com feijão e milho, mas, em parte, o feijão é responsável por este aumento. O mesmo autor ao alimentar cães com milho observou que o valor do nitrogênio fecal era 36% do valor do nitrogênio consumido; quando 32% do milho foi substituído por feijão, a quantidade

de nitrogênio fecal aumentou para 40% do nitrogênio consumido.

Lanfer Marques e Lajolo (1988) determinando a digestibilidade do feijão marcado com ^{15}N , observaram no grupo de ratos alimentados com feijão integral cozido, reduzidos índices de aproveitamento nutricional, acompanhados de uma elevada excreção de nitrogênio, proveniente do próprio feijão (aproximadamente 10 vezes superior a aquela provocada pela ingestão da globulina) acompanhada também de uma alta excreção de nitrogênio endógeno, sendo a soma de ambas responsável pela excreção de 34% do nitrogênio ingerido; isto correspondia a três vezes a excreção causada pela ingestão da dieta de caseína.

O forte estímulo que o feijão exerce no aumento de secreção como no de excreção do nitrogênio endógeno foi observado por vários autores, quer em estado cru - sob a forma integral (Pion et alii, 1979), lectinas isoladas (Pusztai et alii, 1981) ou proteína de reserva, glicoproteína II (Sgarbieri et alii, 1982) - quer em estado integral cozido (Bender e Mohammadiha, 1981).

Oliveira e Sgarbieri (1986) após a injeção intraperitonal de ^{14}C -glicina em ratos, colocaram-os em dietas de caseína, feijão cru, feijão cozido, com teor protéico de

10%, e em aprotéica, durante 4 dias, procedendo às coletas das fezes, com vista a determinar sua radioatividade. A radioatividade em caseína, feijão cozido e feijão cru era, respectivamente, 2, 5 e 10 vezes maior em relação a aqueles com dieta aprotéica. A radioatividade das fezes mostrou uma correlação linear positiva e forte com o nitrogênio excretado nas fezes. Os autores inferiram que a excreção fecal de nitrogênio endógeno constitui um importante fator de redução indireta da digestibilidade. Bender e Mohammadiha (1981) ao determinarem o nitrogênio fecal dos ratos em dieta de caseína, feijão cozido e aprotéica, durante 10 dias, encontraram os valores de 2 e 5,3 vezes maiores, respectivamente, para caseína e feijão cozido, em comparação com aqueles em dieta aprotéica. Os autores atribuem este aumento, em grande parte, à descamação de células do epitélio da mucosa intestinal. Fairweather-Tait e colaboradores (1983) encontraram valores de 2 a 3 vezes maior para nitrogênio fecal dos ratos em dieta de feijão cozido em relação a aqueles em dieta de caseína. De acordo com estes autores é provável que o nitrogênio fecal represente um produto complexo, sendo a maior parte resultado da atividade da flora intestinal.

Assim, pelo exposto, observa-se que a ingestão de feijão ocasiona um aumento de nitrogênio fecal. Este aumento de excreção de N fecal foi atribuído, por um lado, aos cons-

tituintes do feijão, tais como inibidores das proteases, lectinas, compostos fenólicos e polissacarídeos e, por outro, à estrutura de suas proteínas. Esses fatores têm suas influências na susceptibilidade das proteínas às enzimas digestivas e, conseqüentemente, na excreção de nitrogênio exógeno e, por mecanismo ainda não totalmente elucidado, na secreção e excreção de nitrogênio endógeno de várias fontes, como também na atividade e população microbiana no intestino e nas fezes.

2.2.1 Susceptibilidade de proteínas de feijão às enzimas digestivas

A resistência das proteínas nativas do feijão às enzimas digestivas do trato gastro-intestinal, nos mamíferos, foi estudado por Waterman e Johns (1921); Vain Traub e colaboradores (1976); Romero e Ryan (1978); Chang e Satterlee (1981); Bradbear e Boulter (1984) e Deshpande e Nielsen (1987b). Considerável atenção, neste sentido, foi dada à faseolina, a maior proteína de reserva do feijão. A faseolina nativa se mostrou largamente resistente à hidrólise *in vitro*, pela pepsina e quimotripsina (Vaintrauh et alii, 1979; Liener & Thompson, 1980; Deshpande & Nielsen, 1987a). A combinação destas enzimas não superou a resistência desta proteína à hidrólise (Romero & Ryan, 1978;

Vaintraub et alii, 1979). Vaintraub e colaboradores (1979) estudaram a ação da pepsina sobre a proteína 11-S e 7-S de ervilha, 11-S de soja e 7-S de *Phaseolus vulgaris*. As três primeiras proteínas foram completamente hidrolisadas. O índice de hidrólise era próximo ao da hemoglobina, enquanto que para a proteína 7-S de *Phaseolus vulgaris*, a hidrólise cessou quando 2,4% das ligações peptídicas foram clivadas. Liener e Thompson (1980) verificaram que a faseolina nativa, virtualmente isenta da atividade antitriptica, continua mostrando uma resistência superior à hidrólise enzimática do que a caseína. Chang e Satterlee (1981) sugerem que a baixa susceptibilidade da faseolina à hidrólise é particularmente devido à sua estrutura compacta e Romero e Ryan (1978) atribuíram esta baixa susceptibilidade ao impedimento estrutural na proteína. Enquanto a faseolina foi mostrada, por esses autores como sendo largamente resistente à clivagem por endopeptidases puras, há a sugestão de Sgarbieri e colaboradores (1982) de que estas endopeptidases puras, tanto isoladamente como em combinação, são um modelo fraco para o estudo em vivo da digestibilidade desta proteína, e que em torno de 90% de faseolina nativa foi digerida a segmentos solúveis em ácido tricloroacético, após um tratamento sequencial, *in vitro*, com extrato do estômago e intestino delgado de ratos, com pepsina e finalmente com pancreatina. De acordo com os autores, 10 minutos de aquecimento a 100°C, não tinha efeito *in vitro*, no índice ou na extensão da proteólise. Romero e

Ryan (1978) e Liener e Thompson (1980) relatam que um tratamento térmico adequado ocasiona um aumento marcante na hidrólise da faseolina pelas enzimas digestivas. A sua resistência à tripsina e quimotripsina chega próximo à da caseína e à pepsina era menor do que a da caseína. Vaintraub e colaboradores (1976) observaram que a faseolina é completamente hidrolisada pela pepsina após a desnaturação da proteína pelo calor. Bradbear e Boulter (1984) compararam o rendimento de aminoácidos obtidos pela hidrólise ácida da faseolina, com o obtido pela sua hidrólise enzimática. Os valores foram 13% para faseolina crua e 91%, quando cozida. Deshpande e Nielsen (1987b) inferiram que as teorias propostas para explicar a resistência da faseolina à proteólise, tais como, impedimento estrutural, estrutura compactada e estabilidade de sua estrutura tridimensional, não são corretas para a faseolina após tratamento térmico que a torna digerível, *in vitro*, por várias proteases. Estes autores, como também Lanfer Marques e Lajolo (1981), observaram que algumas proteínas, no tratamento com calor, não formam gel, e sugeriram que agregações de proteínas com peso molecular muito alto são formadas durante o aquecimento, e que não são degradadas com tripsina. Deshpande e Damodaran (1989) estudaram a relação entre a estrutura e a digestibilidade *in vitro* da faseolina e vicilina. A faseolina nativa foi mais resistente à tripsina do que a vicilina. O tratamento térmico,

99°C por 15 minutos, influenciou o índice de proteólise das duas proteínas de maneiras diferentes. O produto de clivagem, durante os 10 primeiros minutos da hidrólise, para faseolina cozida e crua era similar; aumentando o tempo de digestão, a faseolina cozida continuou a ser hidrolisada a peptídeos de pesos moleculares menores, o que não aconteceu com os produtos da faseolina nativa. No caso da vicilina, o índice da hidrólise após o aquecimento era quase a metade da vicilina nativa. Foi sugerido que o calor pode ter causado certa mudança na estrutura que conferia à vicilina uma aparente resistência à proteólise. Sathe e colaboradores (1981) observaram que a digestibilidade *in vitro* da farinha de feijão, albuminas, globulinas e proteína no estado cru era de 9%, 3%, 10% e 14% e este valor, após tratamento térmico, passou respectivamente para 64%, 24%, 30% e 24%.

Além da estrutura da proteína, alguns constituintes do feijão, como inibidores de tripsina, foram relatados como os responsáveis pela baixa hidrólise do feijão integral e de suas proteínas isoladas, até mesmo após o aquecimento. Jaffé (1950), ao determinar o aumento da digestibilidade verdadeira de sementes de leguminosas, devido à autoclavagem, verificou que aquelas espécies, incluindo *Phaseolus vulgaris*, que apresentavam o maior aumento, possuíam também a maior atividade antitriptica *in vitro* quando em estado nativo. Habeeb (1966) mostra evidências de que a ausência

deste inibidor aumenta a susceptibilidade da proteína à hidrólise proteolítica. Ele compara a digestibilidade *in vitro* do extrato protéico da soja, cujo inibidor foi extraído, com o extrato original antes e após o aquecimento. Conclui que 40% da diferença de digestibilidade existente entre o extrato de proteína, cozido e cru, era devido à ausência do inibidor da tripsina. Sgarbieri (1980) não encontrou correlação significativa entre a digestibilidade *in vitro* e a atividade do inibidor da tripsina para sementes cruas de leguminosas em algumas da espécie *Phaseolus vulgaris*. Lanfer Marques e Lajolo (1981) observaram que o tratamento térmico melhorou a digestibilidade *in vitro* da fração globulina, enquanto reduziu a digestibilidade da fração albumina. Estes resultados são contrários a aqueles obtidos por Sathe e colaboradores (1982) já relatado. Lanfer Marques e Lajolo (1981) sugerem que o inibidor da tripsina na fração albumina é resistente ao calor e, durante o tratamento térmico, forma com a proteína um agregado de alto peso molecular resistente à hidrólise. Lanfer Marques e Lajolo (1988) com o intuito de determinar a origem do nitrogênio excretado, se endógeno ou exógeno, e da digestibilidade do feijão e suas proteínas, após o cozimento, realizaram um ensaio biológico na qual utilizaram os grãos de feijão marcados em suas proteínas com ^{15}N . As frações protéicas isoladas causaram apenas um discreto aumento na excreção fecal, porém, um grande aumento na excreção, decorrente da influência do feijão integral, foi

observado. Com esses resultados os autores chegaram a interpretar que a presença de alguns componentes no feijão integral, ou um mecanismo a nível intestinal, leva à formação de complexos protéicos indigeríveis, ou então a um estímulo no aumento da secreção de nitrogênio endógeno. A globulina teve uma digestibilidade estatisticamente igual à caseína e a albumina uma digestibilidade relativamente baixa (79%). A limitada digestibilidade da albumina foi atribuída às reações entre carboidratos e proteínas ou mesmo entre taninos e proteínas, com formação de estruturas não digeríveis pelas enzimas digestivas. O elevado teor de glicídeos na fração albumina (300 mg/g proteína) favorece essa hipótese.

Os compostos termo-resistentes, como taninos e ácido fítico, podem contribuir para a baixa susceptibilidade das proteínas à hidrólise proteolítica. Romero e Ryan (1978) ainda que não tenham encontrado nenhuma correlação entre a concentração de taninos nas diferentes linhagens e o índice de hidrólise da proteína, observaram que a adição de taninos implicou em decréscimo na digestibilidade *in vitro*. Bressani e Elias (1980) ao estudarem a qualidade das proteínas do feijão branco e dos cultivares pigmentados de *Phaseolus vulgaris*, observaram que os taninos são resistentes ao calor e diminuem a digestibilidade das proteínas *in vitro*. Foi proposto que, ou o tanino deixa a proteína parcialmente indisponível à hidrólise, ou inibe as enzimas digestivas. Ou-

tros autores como Laurena e colaboradores (1984) mostraram também que taninos diminuem a digestibilidade *in vitro* das proteínas, provavelmente devido à habilidade dos taninos em formarem complexo com as proteínas. O calor minimizou o efeito dos taninos sobre a digestibilidade (Barroga et alii, 1985). Outra substância sugerida como interferente no metabolismo de proteínas é o ácido fítico, que diminui a digestão de proteínas pelas enzimas proteolíticas (O'Dell & Boland, 1976; Deshpande et alii, 1982).

As fibras do feijão podem ter influência na hidrólise das suas proteínas. Bressani (1973) mostrou evidências de que 17% das proteínas do feijão são lignificadas e que não são digeríveis. A filtração em gel de proteínas solúveis e hidrolisado de caseína contendo pectina ou resíduos (sic) de feijão, mostraram a presença de frações peptídicas de pesos moleculares maiores do que as encontradas em hidrolisado de caseína sem fibra (Acton et alii, 1982). De acordo com Martin e colaboradores (1965) e em pH baixo forma-se um complexo entre os grupos sulfato de polissacarídeos e as proteínas, o que protege as mesmas da hidrólise peptídica.

2.2.2 Aumento de secreções enzimáticas e descamação das células da mucosa intestinal

2.2.2.1 Aumento de Secreções Pancreáticas

A estrutura das proteínas do feijão, com sua resistência à enzimas proteolíticas, e seus produtos de digestão, pode ser o fator que aumente a secreção exócrina do pâncreas em dieta contendo feijão como fonte protéica. Foi proposto por Green e Lyman (1972) que a resposta secretora do pâncreas à proteína alimentar é devido à interrupção na inibição "feedback" triptica do pâncreas por proteínas. Assim, pôde-se concluir que proteínas que são atacadas pela tripsina, mas que resistem à hidrólise triptica (um exemplo extremo pode ser o inibidor da tripsina), podem ser particularmente estimulantes para a secreção pancreática. Kakade e colaboradores (1973) mostraram que 40% da hipertrofia ocasionada no pâncreas de ratos alimentados com proteína de soja crua, era devido à natureza refratária da proteína crua à hidrólise da tripsina, a não ser que a proteína fosse desnaturada pelo calor. Green e colaboradores (1973) consideraram o mesmo motivo, natureza refratária, a causa do aumento de secreção pancreática nos ratos alimentados com proteína cozida de soja em relação à caseína. A resistência das proteínas do feijão à hidrólise pelas enzimas digestivas, tanto

devido a sua estrutura como devido à interferência de constituintes do feijão, estáveis ou instáveis ao calor foi exposta, mas não encontrou-se literatura específica sobre o feijão que indicasse o grau de influência que esta resistência pode ter no aumento da secreção pancreática.

A idéia do controle da secreção pancreática, devido à resistência da proteína pelo mecanismo "feedback", tem sentido quando se aceita a hipótese de que a presença de proteína intacta é estimulante da secreção pancreática, como sugerido por Schneeman e Lyman (1975) e Johnson e colaboradores (1977). Existe outra série de autores, como Konturek e colaboradores (1973) e Meyer e Kelly (1976), que defendem a hipótese de que os produtos da digestão das proteínas, como alguns oligopeptídeos, e até alguns aminoácidos, são reguladores da secreção pancreática.

O aumento e a estimulação da atividade secretora do pâncreas dos ratos quando alimentados com grãos crus de leguminosas, foi atribuído à presença de inibidores da tripsina, instáveis ao calor, existente nos grãos de leguminosas (Khayambashi & Lyman, 1966; Gerther & Nitsan, 1970). Lyman e Lepkovasky (1957) administrado, via oral, o inibidor da tripsina, em sua forma cristalina, em ratos, observaram uma secreção pancreática exagerada, não somente de proteases como também de lipase e amilase. O aumento da atividade das

enzimas no pâncreas foi paralelo ao aumento da atividade de enzimas digestivas no intestino delgado. O estudo de inibidor de alfa-amilase de feijão (*Phaseolus vulgaris*) não mostrou aumento da secreção de alfa-amilase no intestino delgado (Lajolo et alii 1991).

Haines e Lyman (1961) mostraram que a resposta produzida pelo inibidor da tripsina no estado cru, baseado na atividade enzimática do pâncreas e intestino, foi 3 a 5 vezes maior do que a resposta produzida pela dieta de soja cozida. Banerji e Sohoni (1969) encontraram para o feijão "Field" uma perda de 59% da atividade inibidora, em 30 minutos, e 86% em 60 minutos, a 100°C e pH 7,2. A autoclavagem, a 15 lb de pressão, destruiu 93% da atividade por minuto. Outros autores mostraram o efeito do calor, com diferentes tempos e pH, sobre os inibidores de várias espécies de feijão (Jones et alii, 1963; Pusztai, 1968; Whitaker & Sgarbieri, 1981). Embora um tratamento térmico adequado destrua a atividade dos inibidores da tripsina, foram detectados na fração albumina de alguns cultivares de *Phaseolus vulgaris*, inibidores de tripsina e quimotripsina resistentes ao calor (Deshpande & Nielsen, 1987b).

2.2.2.2 Aumento da Esfoliação do Epitélio Intestinal

Foi relatado um aumento de esfoliação da mucosa intestinal, em ratos alimentados com feijão cru (Jaffé & Camejo, 1961), ou feijão cozido (Bender & Mohammadiha, 1981; Fairweather-Tait et alii, 1983).

Dentre os fatores que aceleram a ação de descamação das células epiteliais intestinais ocorrida com a dieta contendo feijão integral cru, encontram-se as lectinas. De acordo com King e colaboradores (1980), as lectinas existentes no feijão ligam-se à superfície luminal das vilosidades intestinais dos ratos, ocasionando sérios danos às células epiteliais do intestino e lesão das microvilosidades bem como das vilosidades (Pusztai et alii, 1979; Oliveira et alii, 1989). Tem sido geralmente aceito que as lectinas são substâncias termolábeis, que com tratamento térmico adequado, inativa-se completamente (Antunes & Sgarbieri, 1980). Ainda assim, o feijão cozido provoca a esfoliação. Bender e Mohammadiha (1981) propõem que o aumento do nitrogênio fecal em ratos alimentados com feijão cozido (10% proteína), em comparação com os animais em dieta de caseína ou aprotéica, pode ser devido à aceleração da renovação das células da mucosa intestinal. Sua conclusão foi baseada na determinação da relação entre DNA:N em fezes de ratos alimentados com as referidas dietas, e na estimativa do número de bactérias fe-

cais. Observaram que, enquanto a excreção de DNA não mudou ao comparar a dieta de caseína com a aprotéica, o valor de DNA:N caiu de 0,55 para 0,25. Concluíram que o aumento de N fecal, em ratos alimentados com caseína, em relação à aprotéica, era devido à dieta não digerida ou não absorvida, ou ainda, devido ao aumento do suco digestivo. No caso da dieta do feijão "White Kidney", houve um grande aumento no DNA total, comparando-se com caseína e aprotéica, e a relação DNA:N continuou a mesma. Concluíram também que o aumento do nitrogênio na dieta do feijão foi devido à material celular. Este material pode ser proveniente de bactérias ou do epitélio intestinal. Foi estimado que a quantidade de DNA proveniente de microrganismos, contava somente com 9 a 10% de aumento do DNA fecal. Sugeriram que o aumento de N fecal nos ratos alimentados com feijão, pode ser devido ao aumento massivo do "turnover" das células do epitélio da mucosa intestinal. Fairweather-Tait e colaboradores (1983) mediram o "turnover" da esfoliação da mucosa celular, em ratos alimentados com feijão "White Kidney", em comparação com os ratos em dieta controle de caseína. A esfoliação foi estimada mediante injeção intraperitoneal de timidina marcada com ^3H . A atividade de $^3\text{H}/\text{gr}$ de peso seco de tecidos de jejuno, íleo e cólon, medida em vários intervalos de tempo, permitiu estimar que a perda de ^3H de timidina, e conseqüentemente de DNA marcado, era 35% maior em animais alimentados com feijão, em comparação com aqueles em dieta controle de caseína. Os au-

tores argumentam que a estimacão de 35% de aumento na perda de proteína, devido ao "turnover" de células,  uma quantidade que aparece no contudo do intestino e pode-se esperar que a maior parte desta proteína extra seja disponível  digestão e reabsoro. Alem disso, levaram em considerao o trabalho de Da Costa e colaboradores (1971), que somente 8% a 15% da proteína eliminada pelo intestino delgado, devido  esfoliao,  intracelular, sendo o restante extracelular. Os autores concluíram que seus resultados não permitem a sugestão de que o feijão cozido podia ter ocasionado um efeito tão grande na mucosa intestinal, de modo que esta fonte de nitrogênio endógeno venha a representar um aumento de duas a três vezes de nitrogênio nas fezes.

O aumento da esfoliao da mucosa na dieta de feijão, foi atribuído  sua quantidade de fibra (Fairweather-Tait et alii, 1983; Southon et alii, 1985), pois há evidências de que mudanças similares ocorrem em animais alimentados com dietas ricas em polissacarídeos indigeríveis. Por exemplo, Brown e colaboradores (1979) mostraram que o consumo de pectina parece ser associado a hiperplasia da cripta, em intestino delgado de ratos. O efeito da fibra, sobre a descamao do epitelo da mucosa intestinal, já foi descrito.

2.2.3 Influência da flora bacteriana intestinal, na excreção de nitrogênio fecal

Pion e colaboradores (1979), a fim de verificarem se a diferença de digestibilidade de várias dietas de leguminosas, inclusive de feijão, poderia ser devida à excreção de nitrogênio da dieta, ao nitrogênio endógeno, ou ainda, às bactérias intestinais, calcularam a medida da diferença relativa entre a composição de aminoácidos das fezes, da proteína da dieta e das bactérias do intestino. Observaram que a dieta com feijão cozido, ocasionava a diminuição da excreção de aminoácidos da dieta, e aumentava a proporção de proteína bacteriana quando comparada com caseína. Wilson e colaboradores (1980) observaram um aumento das contagens de coliformes, mais particularmente de *Escherichia coli*, no intestino delgado de ratos alimentados com dieta de feijão do cultivar Processor, com relação à dieta de caseína. Uma possível explicação para o aumento de microorganismos pode ser os carboidratos e fibras do feijão. De acordo com Hellen-doorn (1969), o valor de carboidratos indigeríveis de feijão cozido chega entre 15 a 20%: desta quantidade, 12% a 15% são constituintes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), 3% a 5% são materiais solúveis, como pectina, arabinogalactanas e oligossacarídeos contendo galactose. Devido à falta de alfa-galactosidase no sistema digestivo, os oligossacarídeos, tais como, rafinose, estaquiose e verbas-

cose, não são digeridos no intestino, mas a microflora presente no intestino grosso sintetiza a enzima requerida e fermenta o substrato (Calloway et alii, 1971; Fleming, 1981). Hellendoorn (1969) relata que a produção de CO₂ deve ter origem fermentativa, e que o substrato fermentado em parte, deve ser o amido de feijão não digerido, na parte superior do ileo e que será fermentado na porção inferior do ileo e do cólon. Possivelmente esta fermentação deve ser acompanhada pela putrefação de proteínas de feijão não digeridas no ileo. Wyatt e colaboradores (1988) ao alimentarem os ratos com dieta base, sem fibra, e dietas testes, com diferentes polissacarídeos não digeríveis, observaram que a população bacteriana do ceco e do cólon variava significativamente, aumentando ou diminuindo, dependendo do tipo de fibra. Esta diferença era mais notável em população bacteriana aeróbica. No entanto, nos experimentos feitos com humanos, as várias dietas, inclusive as dietas com alto teor de fibras, não mostraram mudanças significativa na população da flora bacteriana das fezes (Drasar & Jenkins, 1976). Bender e Mohammadiha (1981) realizaram contagens de bactérias viáveis nas fezes do intestino grosso e determinaram o DNA de *Escherichia coli* como microrganismo representativo. Com isso, mostraram que, no caso de ratos em dietas com feijão, o DNA proveniente da flora bacteriana (viável) perfazia apenas 9% a 10% do total de DNA excretado, enquanto que para os em dieta controle, caseína, era 15% a 18%. O DNA total das

fezes dos ratos em dieta de feijão era de 2 a 3 vezes maior do que os em dieta de caseína. Os autores sugeriram que o excesso de DNA nas fezes dos ratos em dieta de feijão provinha do marcante aumento na renovação das células da mucosa intestinal. Nesta conclusão, os autores não levaram em consideração o DNA que poderia ser proveniente dos microrganismos mortos. Harmuthe-Hoene e Sckwerdtfeger (1979) observaram que a adição de goma guar (GG) e goma de feijão carbo (CBG) à dieta de ratos ocasionou aumento da excreção de matéria seca e nitrogênio fecal, sendo que este último aumento foi compensado pela redução de nitrogênio urinário. A quantidade de matéria seca excretada, contudo, era consideravelmente mais baixa do que se podia esperar caso os polissacarídeos ingeridos fossem excretados sem modificação. Os seus resultados mostraram que cerca de 70% a 80% de GG e CBG tinham sido aproveitados pelo organismo e o restante dos polissacarídeos fermentáveis aumentou a atividade de microorganismos e, conseqüentemente, o seu requerimento de nitrogênio. A redução da excreção de nitrogênio urinário mostrou, por outro lado, que este requerimento foi suprido pelo nitrogênio endógeno. Segundo os autores, o aumento de nitrogênio fecal consiste na maior parte, em produtos finais do metabolismo bacteriano ou da própria proteína bacteriana.

Além do exposto, o aumento da excreção do nitrogênio pode ser também devido ao efeito de componentes não di-

geríveis da dieta sobre o aumento de volume e sobre as funções gastrointestinais. Este efeito, muitas vezes, foi relacionado com a atividade de microorganismos. El-Harith (1977) sugeriu que o aumento do ceco era devido à dieta rica em amido, sendo uma resposta adaptativa à mudança de sua microflora. A mesma conclusão foi tomada por Jacobs e Lupton (1984), relatando que polissacarídeos fermentativos causam um aumento maior no ceco do que polímeros não degradáveis. Esta observação parece estar de acordo com o relato de Sakata (1987), mostrando que ácidos graxos de cadeia curta, produtos de metabólitos de microorganismos ao usar carboidratos, estimulam a produção de células epiteliais e causam crescimento da mucosa. Ainda mais, Konishi e colaboradores (1984), relatam que a resposta do ceco, em ratos à dieta contendo glicomanana era mais de hipertrofia celular que propriamente aumento de descamação. Fairweather-Tait e colaboradores (1982) ao alimentarem ratos com dieta de feijão não encontraram nenhuma evidência de aumento de "turnover" de células no intestino grosso, em comparação com dieta da caseína. O aumento da descamação no intestino delgado era de 35%. Wyatt e colaboradores (1988) inferiram que o aumento do cólon é devido à hipertrofia do tecido em resposta ao aumento do volume de seu conteúdo e não é provável que metabólitos da atividade microbiana sejam a causa da resposta trófica observada quando polissacarídeos não digestíveis estão presentes na dieta.

2.3 Métodos de determinação de nitrogênio endógeno

A diversidade das fontes que dão origem às secreções endógenas, sua complexidade bioquímica e a importante influência dos nutrientes na sua magnitude, são de grande interesse. Entretanto, pelos processos físicos e químicos é impossível separar efetivamente na digestão os componentes endógenos daqueles da dieta. O método convencional utilizado para medir o nitrogênio endógeno fecal era o método aprotéico. Esta determinação estava baseada no fato de que a excreção de nitrogênio metabólico está relacionada com a quantidade de matéria seca consumida. Assim sendo, o nitrogênio metabólico fecal (NMF) podia ser determinado colocando os animais em dieta livre de nitrogênio e o medindo nas excreções fecais. Mitchell e Carman (1926) ao estudarem o valor biológico das misturas de farinha de trigo com diversas proteínas animais na proporção 2:1, verificaram que o uso de uma dieta contendo de 0,6% a 0,75% de nitrogênio de ovo integral era preferível ao uso de uma dieta aprotéica. Schneider (1934) fez uma revisão, levando em consideração dois fatores : peso do animal e a quantidade de alimento consumido, na excreção do NMF. A revisão incluiu 1.160 determinações de NMF, com ratos de diferentes pesos e de vários níveis de consumo de dieta. O autor observa que o NMF consiste de duas frações: uma fração que é constante e proporcional ao peso do corpo, e uma segunda que é proporcional

à quantidade de matéria seca ingerida; informa ainda que o NMF atinge praticamente um nível constante para determinado consumo de alimento, acima de um valor mínimo, que parece ser aquele próximo ao que é requerido para a manutenção do peso do corpo. Boshardt e Barnes (1946) determinaram o nitrogênio fecal através de método gráfico de regressão linear. Para esta determinação levaram em conta a ingestão de nitrogênio consumido por unidade de dieta ingerida em níveis protéicos diferentes, e a excreção de nitrogênio fecal por unidade de dieta consumida. A linha obtida foi extrapolada para o ponto zero de nitrogênio consumido. O valor Y foi usado como o valor para NMF por unidade de alimento consumido.

Keith e Bell (1988) investigaram a estimacão de NMF pelos dois métodos, sugeridos por Boshardt e Barnes (1946) e Mitchell (1924). Determinaram em ratos, a digestibilidade aparente e verdadeira de nitrogênio e aminoácidos de sete fontes protéicas, a saber: caseína, gelatina, gliadina, lactalbumina, proteína de soja e proteína de milho. Concluíram que quando uma proteína é ministrada aos ratos, a excreção de NMF pode ser determinado por ambos os métodos, mas os mesmos não podem ser aplicados quando a fonte protéica contém substâncias antinutritivas.

Skilton e colaboradores (1988) alimentaram ratos com quatro tipos de dieta nas quais a única fonte de nitrogênio foi a mistura sintética de aminoácidos. Cada dieta foi formulada para ser isenta de dois aminoácidos a saber: dieta I - destituída de ácido aspártico e serina, dieta II - de ácido glutâmico e prolina, dieta III - de glicina e alanina e dieta IV - de ácido glutâmico e lisina. O fluxo de aminoácidos endógenos no íleo de animais alimentados com cada uma destas dietas foi comparado com os em dieta aprotéica. Os fluxos não eram significativamente diferentes, para ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e lisina, mas eram significativamente maior para prolina, glicina e alanina na dieta aprotéica. Moughan e Rutherford (1990) para determinação do fluxo de lisina e outros aminoácidos do íleo, alimentaram ratos com dietas de caseína hidrolisada, gelatina, em que a lisina tinha sido parcialmente transformada em homoarginina (através da reação de guanidinação), e/ou dieta aprotéica. O trabalho mostrou que o fluxo de lisina endógena juntamente com o fluxo endógeno de outros aminoácidos no terminal do íleo, na condição normal, pode ser significativamente subestimada quando a medição é feita na condição de alimentação aprotéica. Os autores relatam que a proteína guanidinada pode ser um meio para determinação de aminoácidos endógenos.

Para estudar o valor nutricional das proteínas de leguminosas e a contribuição do nitrogênio de origem endó-

geno para o nitrogênio total encontrado nas fezes e urinas de ratos alimentados com dietas contendo leguminosas, como única fonte de proteína, foram utilizadas leguminosas marcadas isotopicamente em suas proteínas. A incorporação de ^{15}N pelo vegetal ocorreu durante seu cultivo (Oliveira & Sgarbieri (1986^b); Lanfer Marquez & Lajolo, 1988; Domene, 1990). Os resultados destes autores mostraram que os animais alimentados com dietas de grãos de leguminosas, mesmo cozidos, excretaram maior quantidade de material endógeno do que os animais com dietas aprotéicas ou caseína, e, conseqüentemente, os valores encontrados para digestibilidade e valor biológico reais de proteínas eram superiores aos aparentes e verdadeiros, indicando a impropriedade da utilização de dieta aprotéica para ensaios nutricionais de grãos de leguminosas.

A técnica da marcação do animal com ^{15}N para avaliação de digestibilidade das proteínas do feijão-fava (*Vicia faba*) foi utilizado por Bergner e colaboradores (1984). Neste caso, o animal incorporou o isótopo por ingestão de cloreto de amônio enriquecido com 96 átomos % de ^{15}N em excesso, misturado à dieta. A abundância de ^{15}N nas proteínas pancreáticas e nos demais sistemas digestivos era bastante semelhante àquela encontrada na urina destes animais. Assim a porcentagem de ^{15}N em excesso na urina foi indicativa da eliminação do isótopo neste sistema.

Shahkhalili e colaboradores (1990) na tentativa de identificar a fonte de nitrogênio extra excretado nas fezes (N endógeno versus N da dieta), quando a dieta é rica em polifenóis, também utilizaram ^{15}N . Os ratos receberam uma injeção intravenosa de ^{15}N -glicina na veia caudal. As fezes foram coletadas diariamente e o ^{15}N foi determinado para cálculo do nitrogênio endógeno. Os resultados indicaram que alimentos ricos em polifenóis tem efeitos variáveis na secreção de N em fezes.

O uso de isótopos radioativos também tem sido outro método para observar o aparecimento de proteínas endógenas, peptídeos e aminoácidos no trato gastrointestinal de ratos, após injeção intravenosa ou intraperitonal de aminoácidos marcados. Jacobs (1965) observou que, alguns minutos após a injeção de 5 μCi de ácido aspártico ^{14}C já era possível sua detecção no conteúdo luminal. Ochoa-Solano e Gilter (1967) isolaram proteínas endógenas do estômago e intestino delgado de ratos, 2 horas após a injeção de metionina marcada com enxofre 35 na veia caudal. Oliveira e Sgarbieri (1986) para estudar o efeito da dieta contendo feijão seco na excreção de nitrogênio endógeno, injetaram glicina marcada uniformemente com ^{14}C , em ratos. Comparando a radioatividade fecal dos ratos em dieta de feijão cozido, feijão cru, caseína +2,7% de fibra e aprotéica, obtiveram o seguinte resultado: as radioatividades das fezes de animais,

em dietas de caseína, feijão cozido e feijão cru, foram respectivamente 2,5 e 10 vezes maiores do que nas fezes de animais que receberam dieta aprotéica. Para assegurar que a radioatividade do ^{14}C estava ligada ou relacionada com o nitrogênio excretado, e o método ser válido para a determinação do nitrogênio endógeno, os autores calcularam, em várias dietas, a correlação entre radioatividade e o nitrogênio fecal, observando uma correlação forte com $r = 0,9564$, mostrando que a glicina excretada estava ligada às proteínas do rato ou em forma livre.

Os nucleotídeos radioativos, precursores de ácidos nucléicos, especialmente timidina tritiada, foram utilizados para estimação da esfoliação de células epiteliais, uma das fontes de nitrogênio endógeno. Fairweather-Tait (1982) para estudar o efeito que o feijão exerce sobre a excreção endógena de nitrogênio, e o "turnover" de células da mucosa em ratos, injetou nos animais ^3H -timidina, colocando-os em dieta de caseína e feijão. Foi determinado a atividade média do $^3\text{H}/\text{g}$ em tecidos do jejuno, íleo e cólon, em períodos de 24, 48 e 72 horas. O método baseou-se no princípio de que os DNAs, das células em divisão, podem ser seguramente marcados com ^3H de timidina, num período curto, após a sua administração, e subsequente clivagem metabólica. A atividade do ^3H nos tecidos de proliferação permanece estável, enquanto as células amadurecem, e esta atividade diminui quando as célu-

las envelhecem, e são eliminadas da população. A autora encontra uma diminuição de 35% na radioatividade dos tecidos dos animais em dieta de feijão comparando com aqueles em dieta de caseína.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Feijão

Utilizou-se grãos de dois cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*), Carioca 80 e Aeté-3, da safra das águas de 1987, colheita em fevereiro de 1988, proveniente da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico, Campinas, SP, com teor protéico médio (N x 6,25) de 22,0 e 22,9%, respectivamente.

3.1.2 Caseína

Caseína comercial, procedente do Uruguai, contendo 86,1% de proteína bruta.

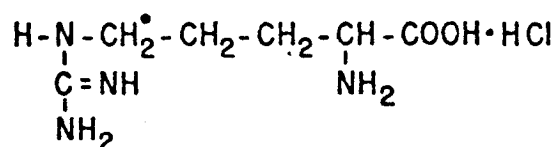
3.1.3 Ração Comercial

Dieta não purificada de fórmula fechada Labina, da Purina Nutrimentos Ltda., com teor mínimo de proteína de 23,0% (especificação do fabricante).

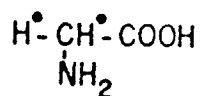
3.1.4 Aminoácidos Marcados com Trítio

Foram utilizados para marcação das proteínas dos ratos, soluções aquosas, esterilizadas, contendo 1 mCi/mol de :

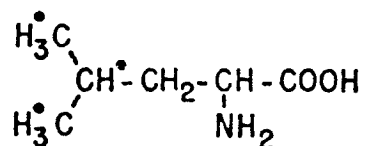
L - [5 - ^3H]-arginina monoclóridato, contendo 16,7 Ci/mmol de radioatividade específica



[2 - ^3H]-glicina, contendo 2,8 Ci/mmol de radioatividade específica



DL [4,5- ^3H]-leucina, contendo 54 Ci/mmol de radioatividade específica

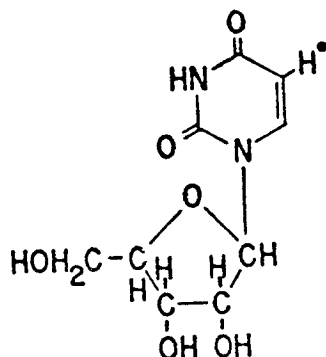


Proveniência de The Radiochemical Center, Amersham International plc, England.

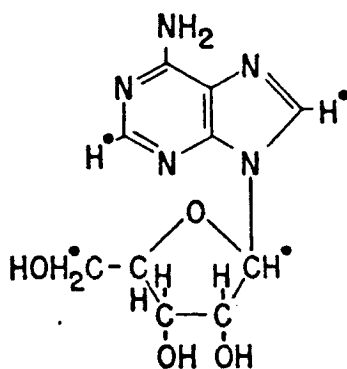
3.1.5 Nucleosídeos Marcados com Trítio

Foram utilizados para marcação dos ácidos nucleicos dos ratos, soluções aquosas, esterilizadas, contendo 1 mCi/mL de:

[5 - ^3H]-uridina contendo 29 Ci/mmol de radioatividade específica



[G - ^3H]-adenosina contendo 6,6 Ci/mmol de radioatividade específica



Proveniência de The Radiochemical Center, Amersham International plc, England.

Os átomos assinalados nas fórmulas dos aminoácidos e nucleosídeos correspondem aos átomos de trítio.

3.1.6 Animais Utilizados nos Ensaio Biológicos

Foram utilizados ratos albinos machos da linhagem Wistar, procedentes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, SP. Os ratos, com uma a duas semanas após o desmame, eram colocados em gaiolas de crescimento individual com ração comercial e água à vontade, no Laboratório de Ensaio Biológicos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, com temperatura ambiente controlada de 24°C. O tempo de aclimação foi de 2 dias e os ratos pesavam ao final $73,6 \pm 8,6$ em média. Foram realizados cinco ensaios biológicos A, B, C, D e E, que serão descritos em seções posteriores. Os ratos, após 16 horas de jejum e dois dias de adaptação à dieta, pesavam em média $70,0 \pm 9,1$ g ao começo do balanço. No ensaio B, o período de aclimação chegou a 15 dias em dieta comercial, devido a que o liofilizador encontrava-se em conserto e atrasou a preparação da dieta. Assim, neste ensaio, os ratos pesaram em média $160,0 \pm 13,2$ gramas no começo do balanço.

3.2 Métodos

3.2.1 Análises Químicas e Bioquímicas

3.2.1.1 Umidade: a umidade foi determinada segundo o método descrito pela AOAC (1980), utilizando estufa a 100-110°C até peso constante.

3.2.1.2 Lípides totais: o método utilizado consiste de uma modificação do método de Bligh e Dyer (1959).

3.2.1.3 Cinzas: foram determinadas pela incineração do alimento a 500-550°C em forno de mufla, obtendo-se assim o resíduo mineral fixo, conforme Instituto Adolfo Lutz (1976).

3.2.1.4 Fibra: o método utilizado para a determinação da fibra era o de Weende, segundo Pearson (1976) onde simula-se *in vitro* o processo de digestão *in vivo*. O resíduo da digestão deduzido do teor de cinzas, representa a fibra bruta.

3.2.1.5 Nitrogênio: o conteúdo de N total foi determinado por método semimicro-Kjeldahl. Utilizou-se sulfato de cobre e de potássio (Gunning, 1889; Arnold & Wedemeyer, 1892, apud Montes, 1966) e dióxido de titânio (Williams, 1973), como catalisadores da digestão das amostras.

3.2.1.6 Proteína: foi determinada em termos de "proteína bruta", multiplicando-se os teores (%) de nitrogênio total pelo fator de conversão de nitrogênio para proteína, 6,25 no caso de feijão e 6,38 para a caseína, segundo Paul e Southgate (1978).

3.2.1.7 Determinação da radioatividade do trítio [^3H]: a radioatividade das amostras de aminoácidos enucleosídeos foi determinada pela adição direta de 5 μL de solução diluída 1/50 de amostra em 5 mL do líquido de cintilação, Instagel, de Packard Instruments International S.A., Zurich, Switzerland. Da mesma forma procedeu-se para as urinas, que eram recolhidas em ácido sulfúrico e completado o seu volume com água, para 50 mL. Na determinação da radioatividade das fezes e tecidos, utilizou-se aparelho Beckman Biological Oxidizer Material, sendo o vapor da água resultante da combustão recolhido em tubo que estava imerso em gelo-seco. Terminada a combustão, a água recolhida no tubo foi transferida para o frasco do cintilador com auxílio de 10 mL de líquido de cintilação. A contagem foi efetuada em cintilador líquido Beckman LS 7000. Os cálculos para transformação de contagem por minuto (CPM), dado pelo aparelho, para μCi foi baseado em Segel (1968).

3.2.1.8 Determinação de RNA: a extração foi feita conforme procedimento de Schmidt-Thannhauser, que utiliza espectro-

fotometria ultra-violeta na quantificação, modificado por Munro (1961). O método baseia-se na absorção característica da luz ultra-violeta pelos componentes purínicos e pirimidínicos das moléculas de ácidos nucleicos. A determinação quantitativa foi feita através da curva padrão de RNA, sendo o valor de RNA expresso em mg/g de fezes. Utilizou-se como padrão, RNA proveniente de leveduras, Kocha-Light Laboratories Ltd.

3.2.1.9 Cortes Histológicos: os cortes histológicos de intestino delgado foram feitos conforme Barka e Anderson (1963). A técnica constava da retirada de amostras dos órgãos, e fixação das mesmas em formol a 4%, durante 48 horas. Foi seguida pela desidratação das amostras em sucessivas soluções de álcool etílico, clarificação com xilol, impregnação em parafina e xilol, e finalmente inclusão em parafina. Foram seccionados os blocos em cortes semi-finos, de 2 a 4 um, e montados em lâmina.

3.2.1.10 Radioautografia: as lâminas contendo os cortes semi-finos, desparafinizados e hidratados foram cobertas com emulsão fotográfica marca ILFORD K.5D, England, da seguinte forma : 2 a 3 gotas de emulsão liquefeita à 42°C e diluída 1:1 com água, foram colocadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur ao lado dos cortes e, a seguir, com o auxílio da mesma pipeta, espalhadas sobre a preparação. Imediatamente

após a cobertura dos cortes, as lâminas foram colocadas verticalmente em caixas pretas vedadas com fita isolante preta e mantidas a 4°C durante 30 dias (Blumen & Merzel, 1976; Nogueira, 1978).

3.2.1.11 Técnica Fotográfica: as lâminas após 30 dias foram tiradas das caixas pretas, reveladas, fixadas e posteriormente coradas com hematoxilina e eosina. Para fotomicrografia foi utilizado um microscópio óptico de rotina.

3.2.2 Ensaios Biológicos

3.2.2.1 Preparação da Farinha Integral de Feijão Cozido: os grãos de feijão foram macerados em água por 12h, à temperatura ambiente, na relação 1:3. Em seguida, eram submetidos ao cozimento em panela de pressão, adicionando mais 1 porção de água, de conformidade com procedimento doméstico. Os feijões após cozimento, foram liofilizados em liofilizador Virtis, modelo número 10.146 MR-BA. Os grãos liofilizados apresentaram teor protéico de 23,1% e 23,8% respectivamente, para Aeté-3 e Carioca 80. No ensaio B, devido a defeito no liofilizador, os grãos foram secados em estufa com circulação de ar, da FANEM modelo 330. A temperatura inicial foi 80°C durante as primeiras 3 horas e depois 50-60°C, durante 18 horas. Os grãos secos continham $9,0 \pm 0,5\%$ de umidade e teor protéico igual a 22,1 para Carioca 80 e 22,6% para

Aeté-3. Os feijões, liofilizados e/ou secos, foram moídos em moinho de facas de Máquinas Renard, modelo MFC 130-75-01 e depois passados no sistema de quebra de moinho Bradender Quadrumat Senior.

3.2.2.2 Preparação das Dietas: as dietas foram preparadas segundo a AOAC (1975). Como as dietas de feijão continham 2,5% de fibra bruta, teor mais alto do que o recomendado pela AOAC, adicionou-se mesmo teor de celulose (microfina, grau farmacêutico, Microcel, de Blanver) às dietas de caseína e aprotéica. Esta adição tinha a intenção de simular o possível efeito fisiológico e/ou bioquímico, já referido, da fração fibra existente no feijão integral nos ratos, embora sabendo-se que esta é de complexidade bem maior. Assim, tal adição teve mais particularmente a finalidade de padronizar as dietas experimentais no tocante a sua composição centesimal. Os teores percentuais médios de proteína bruta obtidos nos diferentes ensaios foram de $11,2 \pm 0,5$; $11,3 \pm 0,4$ e $10,7 \pm 0,7\%$ para as dietas de feijão Carioca 80, Aeté-3 e caseína, respectivamente, sendo que a composição da mistura salina utilizada foi aquela especificada pela AOAC (1975), e a mistura vitamínica para fortificação de dieta, de acordo com Nutritional Biochemicals Corporation (NBC) (1978). As formulações das dietas, da mistura salina e da pré-mistura vitamínica, estão dispostas nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. O óleo vegetal utili-

zado foi de milho (Mazola). A fração carboidrato que completa a dieta a 100% foi fornecida com 25% de sacarose (açúcar União) e 75% com amido de milho (Maizena).

TABELA 1. Formulação das dietas utilizadas nos ensaios biológicos, segundo AOAC (1975).

Componentes	Dietas Protéicas (%)	Dieta Aprotéica (%)
Proteína	10	0
Oleo Vegetal	8	8
Mistura Salina	5	5
Mistura Vitamínica	2	2
Celulose	1,7	1,7
Carboidrato q.s.p.	100	100

TABELA 2. Formulação da mistura salina utilizada nos ensaios biológicos segundo AOAC (1975).

Componentes	Fórmula	Porcentagem
Cloreto de Sódio	NaCl	13,930
Iodeto de Potássio	KI	0,0790
Fosfato Mono-Potássico	KH ₂ PO ₄	38,900
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄	5,730
Carbonato de Cálcio	CaCO ₃	38,140
Sulfato de Ferro	FeSO ₄ .4H ₂ O	2,700
Sulfato de Manganês	MnSO ₄ .4H ₂ O.	0,401
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,047
Cloreto de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002

TABELA 3. Formulação da mistura(*) vitamínica para fortificação de dieta (Pré-Mistura preparada pela Roche) utilizada nos ensaios biológicos, segundo National Biochemicals Corporation (1977/1978).

Componentes	Gramas
<u>Parte A</u>	
Vitamina A Palmitato 250 C.W.S.	3,60
Vitamina D3 Pó 100 C.W.S.	1,00
Vitamina E Pó 50% SO	10,00
Acido Ascórbico	45,00
Cloreto de Tiamina	1,00
Cloreto de Piridoxina	1,00
Biotina	0,02
Pantotenato de Cálcio	3,00
Acido Fólico	0,09
Riboflavina	1,00
Cianocobalamina 0,1%	1,35
Inositol	5,00
Menadiona	1,47
Acido para-Aminobenzóico	5,00
Niacina	4,50
Dextrose	<u>416,12</u>
	500,00
<u>Parte B</u>	
Cloreto de Colina 50%	150,00
Dextrose	<u>350,00</u>
	500,00

(*) Mistura igual das duas partes feita no momento de uso.

3.2.2.3 Determinação da Digestibilidade e Valor Biológico: a digestibilidade e o valor biológico das proteínas foram estimados tendo-se por base o balanço de nitrogênio. O nitrogênio ingerido com a dieta, o nitrogênio fecal e urinário foram determinados. A digestibilidade aparente e verdadeira foi calculada conforme descrito por Wolzack e colaboradores (1981) e Liener e Thompson (1980), respectivamente, e o valor biológico aparente e verdadeiro segundo Pellet e Young (1980).

3.2.2.4 Ensaio A: para este balanço, os ratos sofreram jejum durante 16 horas (Oliveira, 1986), com água à vontade, e foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais e nas dietas balanceadas de caseína, feijão cv. carioca 80, feijão cv. Aeté 3, com $11,5 \pm 1,2\%$ de proteína e aprotéica. Após dois dias de adaptação, pesando em média $69,5 \pm 8,5$ g, receberam injeção intraperitoneal de 125 μ L de solução aquosa de L-[5- 3 H]-arginina-monocloridato, equivalente a 50 μ Ci. Utilizou-se 8 ratos por dieta e um balanço de nitrogênio de 4 dias, sendo que, em cada dieta, foram mantidos 3 ratos controle, sem aplicação de 3 H-arginina. O nitrogênio das fezes e urinas, sendo estas últimas recolhidas em 10 mL de ácido sulfúrico 20%, e suas radioatividades, foram determinadas, visando comparar a excreção de nitrogênio endógeno dos ratos nas várias dietas e verificar se a injeção do marcador radioativo, tinha influência nos desempenhos dos ratos e nos índices de

qualidade protéica das dietas, mais particularmente, digestibilidade e valor biológico aparentes e verdadeiros. Paralelamente, 10 ratos foram injetados com 50 μCi de ^3H -arginina, colocados nas dietas de caseína e de feijão cv. Carioca 80 (5 em cada dieta), e sacrificados após 6, 24, 48, 72 e 96 horas. Na dissecação, o intestino delgado e conteúdo do intestino grosso foram removidos e liofilizados para posterior determinação da radioatividade, visando comparar a liberação gradativa da radioatividade entre os ratos nas duas dietas. Realizou-se também cortes histológicos do intestino para radioautografia.

3.2.2.5 Ensaio B: à semelhança do balanço anterior, os ratos mantidos em gaiolas metabólicas foram submetidos a um jejum por 16 horas, com água à vontade, sendo posteriormente alimentados com dietas de caseína, feijão cv. Carioca 80, feijão cv. Aeté-3, contendo uma porcentagem média de proteína bruta de $11,0 \pm 0,1\%$, e dieta aprotéica. Após dois dias de adaptação às dietas, os ratos apresentando um peso médio de $167,3 \pm 15,8$ g (neste ensaio, o período de aclimação foi de 15 dias, conforme descrito), foram submetidos à injeção intraperitoneal de uma dose única de 125 μL de solução aquosa de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-glicina}$ equivalente a 42 μCi . Utilizou-se 4 ratos por dieta e procedeu-se a um balanço de nitrogênio de 4 dias. Determinou-se o nitrogênio de fezes e urinas e suas radioatividades. Visava-se, com este balanço, compa-

rar-se a excreção de nitrogênio endógeno dos ratos nas diversas dietas e determinar, a título de monitoramento, a digestibilidade e valor biológico das proteínas das dietas de caseína e de feijão.

3.2.2.6 Ensaio C: neste balanço, os ratos jejunos eram colocados nas dietas já referidas nos balanços anteriores, com uma percentagem média de $11,3 \pm 0,5\%$ de proteína. Após dois dias de adaptação às dietas, os ratos pesando $79,3 \pm 6,6$ g, receberam a injeção intraperitoneal de 125 μ L de solução aquosa de DL-[4,5- 3 H]-leucina, equivalente a 45 μ Ci. Posteriormente, procedeu-se a um balanço de nitrogênio de 4 dias, utilizando 6 ratos por dieta, determinando-se o nitrogênio das fezes e urina e suas radio-atividades, visando-se, com este balanço, à semelhança do anterior, fazer uma comparação da excreção do nitrogênio endógeno. Paralelamente, foram injetados em 4 ratos 45 μ Ci de DL-[4,5- 3 H]-leucina, sendo colocados em dieta de feijão Carioca 80. Estes ratos foram sacrificados por asfixia com éter etílico e dissecados em 24, 48, 72 e 96 horas. Na dissecação, os intestinos delgados dos ratos, foram removidos e liofilizados para determinações de radioatividade. No mesmo tempo, porções do intestino delgado foram colocadas em fixador formaldeído, para posteriores cortes histológicos e radioautografia, a fim de observar a incorporação e/ou a liberação gradativa da radioatividade.

3.2.2.7 Ensaio D: após o jejum dos ratos foram colocados nas dietas de caseína, de feijão Carioca 80, com teor protéico médio de $10.8 \pm 0,9\%$ e aprotéica. Completados dois dias de adaptação, os animais pesando em média $66,9 + 7,8$ g, receberam aplicação intraperitoneal de 125 μ L de solução aquosa de adenosina tritiada, [G- 3 H]-adenosina, equivalente a 50 μ Ci. Utilizou-se 6 ratos por dieta e procedeu-se a um balanço de nitrogênio de 4 dias, sendo dois ratos utilizados como controle (sem aplicação de 3 H-adenosina), visando estabelecer até que ponto o aumento da excreção endógena de nitrogênio seria devido à descamação dos enterócitos, através da marcação dos ácidos nucleicos e posterior determinação de RNA e contagem da radioatividade nas fezes. Neste balanço, também foram determinados a digestibilidade e valor biológico das proteínas das dietas. Após o balanço, os ratos foram sacrificados e dissecados, removendo-lhes os intestinos delgados, que foram liofilizados para a determinação de radioatividade. Paralelamente, realizou-se um monitoramento com radioautografia.

3.2.2.8 Ensaio E: neste ensaio foram utilizados ratos de peso médio $60,5 \pm 5,7$ g, que foram colocados em dietas de caseína e feijão Carioca 80 com teor protéico de $11,0 \pm 0,3\%$, sendo 6 ratos em cada dieta. Após 15 dias nas dietas, os animais pesando $120,1 \pm 6,5$ g receberam a injeção intraperitoneal de 300 μ L de solução aquosa de [5- 3 H]-uridina,

equivalente a 120 μCi , visando a marcação do ácido ribonucleico (Schaer et alii, 1969). Após 2, 6 e 12 horas da injeção, dois ratos em cada dieta foram sacrificados. Realizou-se a remoção do intestino delgado para determinação da radioatividade e autorradiografia, visando estudar a incorporação da radioatividade através da marcação dos ácidos nucleicos, especialmente RNA e a sua liberação, através da descamação dos enterócitos.

3.2.3 Tratamento Estatístico

Empregou-se a distribuição completamente randomizada ("Completely Random Design" ou CRD) para o delineamento experimental (Bender et alii, 1982).

As diferenças de médias foram testadas pela análise de variância e posteriormente foi aplicado o teste de Duncan para determinar os grupos que, em média, tinham respostas estatisticamente semelhantes.

Foi calculada a correlação e regressão linear simples entre as variáveis dependentes e independentes do estudo. Procurou-se a presença de pontos estranhos "outliers" mediante a distância de Cook, pois estes pontos poderiam interferir na procura do modelo de regressão, tendo como re-

sultado correlações baixas. Quando foram encontrados, as análises foram refeitas eliminando estes pontos.

Para a execução das metodologias estatísticas acima descritas, foram utilizadas as sub-rotinas do pacote estatístico "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSSPC/+).

Nos diagramas de dispersão em que serão dispostas as regressões lineares, que explicam as relações entre duas variáveis será utilizada a seguinte notação para os pontos: (*) pontos experimentais; (.) pontos estimados de ajuste das retas; (\$) coincidência de pontos experimentais e de ajuste.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1 Composição centesimal

A Tabela 4 apresenta a análise centesimal da farinha integral dos grãos de feijão dos dois cultivares, Carioca 80 e Aeté 3, utilizados como fontes protéicas para preparação das dietas balanceadas. Os valores apresentados mostram, para os cultivares referidos, a composição centesimal típica, já descrita para grãos de feijão (Tobin & Carpenter, 1978).

4.2 Ensaio de Balanço de Nitrogênio

Os valores médios, com os respectivos desvios-padrões, referentes ao consumo de dieta, variação de peso durante adaptação e balanço, e o peso das fezes durante o balanço, referente aos ensaios A,B,C, e D, estão dispostos respectivamente nas Tabelas 5, 6, 7 e 8. Através dos dados das Tabelas 5 e 8, quando comparados os ratos injetados com os não injetados, verifica-se que a injeção de aminoácido tritiado (^3H -arginina) e nucleosídeo tritiado (^3H -adenosina) não teve efeito significativo no consumo da dieta, no ganho de peso dos ratos e no peso das fezes durante o balanço. Ou-

TABELA 4. Composição centesimal (g/100 g) da farinha integral de feijão, cultivares Carioca 80 e Aeté 3.

Cultivar	Proteína	Lipídios Totais	Fibra Bruta	Cinzas	Umidade	Carboidratos (1)
Carioca 80	22,0	2,2	3,8	3,5	11,0	57,5
Aeté 3	22,9	1,6	3,8	3,9	10,2	56,6

(1) valor obtido por diferença.

TABELA 5. Ensaio A. Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos¹ Mistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 uCi de ³H-Arg, colocados nas dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas (11,5 ± 1,0%), e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados.

Dieta	Dieta Consumida	Variação de Peso (g)		Peso de Fezes
	no Balanço (g)	Adaptação	Balanço	no Balanço (g)
	(a) n.s.	(a) n.s.	(a) n.s.	(a) n.s.
Caseína	56,8 ± 4,1	10,5 ± 1,6	24,4 ± 1,5	2,5 ± 0,3
Caseína ²	52,3 ± 6,7	9,7 ± 2,3	22,5 ± 5,1	2,2 ± 0,1
	(b) n.s.	(b) n.s.	(b) n.s.	(b) n.s.
Carioca 80	39,0 ± 5,4	5,8 ± 2,2	4,0 ± 1,6	4,2 ± 0,7
Carioca 80 ²	41,0 ± 7,0	6,7 ± 0,6	8,3 ± 5,1	4,1 ± 0,8
	(b) n.s.	(b) n.s.	(b) n.s.	(b) n.s.
Aeté 3	39,0 ± 5,4	6,4 ± 2,2	3,6 ± 2,9	3,9 ± 0,8
Aeté 3 ²	33,7 ± 5,7	7,0 ± 2,9	5,5 ± 3,7	4,1 ± 0,7
	(b) s.	(c) n.s.	(c) n.s.	(c) n.s.
Aprotéica	35,0 ± 5,6	1,0 ± 0,7	-2,8 ± 1,3	1,0 ± 0,1
Aprotéica ²	25,3 ± 0,5	1,3 ± 5,5	-3,2 ± 4,9	0,6 ± 0,2

(1) - Os resultados representam as médias para 5 ratos em ensaio e 3 ratos controle, respectivamente pesando em média 69,5 ± 8,5 g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas durante 2 dias

(2) - Ratos controle que não foram injetados com ³H-Arg.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalado com a mesma letra, não diferem (p < 0,05).

(n.s.) - não significativo em relação aos ratos controle.

(s.) - diferença significativa (p<0,02) em relação aos ratos controle

TABELA 6. Ensaio B. Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos¹ Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 42 uCi de ³H-Gly, colocados nas dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes proteicas (11,0 ± 0,1%) e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias

Dieta	Dieta Consumida	Variação de Peso (g)		Peso de Fezes
	no Balanço (g)	Adaptação	Balanço	no Balanço (g)
Caseína	59,8 ± 4,9 (a)	12,8 ± 4,3 (a)	13,5 ± 4,8 (a)	2,5 ± 0,5 (a)
Carioca 80	51,3 ± 8,6 (ab)	10,3 ± 5,7 (ab)	-0,8 ± 2,2 (b)	7,5 ± 1,2 (b)
Aeté 3	43,8 ± 7,6 (bc)	4,8 ± 1,5 (bc)	-5,8 ± 4,3 (bc)	6,5 ± 0,3 (b)
Aprotéica	36,0 ± 3,6 (c)	-1,5 ± 4,0 (c)	-9,8 ± 2,1 (c)	1,4 ± 0,4 (c)

(1) - Os resultados representam a média para 4 ratos, pesando 167,3 ± 7,3 g, após jejum de 16 horas e dois dias da adaptação às dietas.

(a,b,c) - Os valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem (p < 0,05)

TABELA 7. Ensaio C. Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos¹ Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 45 uCi de ³H-Leu, colocados nas dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, Aetê 3 e caseína, como fontes protéicas ($11,3 \pm 0,6\%$), e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias.

Dieta	Dieta Consumida	Variação de Peso (g)		Peso de Fezes
	no Balanço (g)	Adaptação	Balanço	no Balanço (g)
Caseína	46,0 \pm 7,5 (a)	13,0 \pm 2,1 (a)	11,2 \pm 3,0 (a)	2,8 \pm 0,5 (a)
Carioca 80	28,1 \pm 4,5 (b)	3,3 \pm 2,4 (b)	0,4 \pm 1,4 (b)	3,3 \pm 1,0 (a)
Aetê 3	32,7 \pm 9,6 (b)	3,5 \pm 2,2 (b)	0,8 \pm 3,0 (b)	4,5 \pm 1,5 (b)
Aprotéica	22,4 \pm 4,8 (c)	-2,4 \pm 1,1 (c)	-5,6 \pm 0,9 (c)	0,6 \pm 0,2 (c)

(1) - Os resultados representam a média para 6 ratos, pesando $79,3 \pm 6,6$ g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas, durante 2 dias.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem ($p < 0,05$)

TABELA 8. Ensaio D. Quantidade de dieta consumida, de fezes excretadas e variação de peso em ratos¹ Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 uCi de ³H-adenosina, colocados nas dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, caseína, como fontes protéicas (11,8 ± 0,9%) e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados

Dieta	Dieta Consumida		Variação de Peso (g)		Peso de Fezes no Balanço (g)
	no Balanço (g)		Adaptação	Balanço	
	(a) n.s.	(a) n.s.	(a) n.s.	(a) n.s.	(a) n.s.
Caseína	54,1 ± 0,4	15,0 ± 0,4	17,1 ± 4,0	2,2 ± 0,5	
Caseína ²	56,1 ± 0,0	13,4 ± 3,3	24,5 ± 2,6	2,1 ± 0,1	
	(b) n.s.	(b) n.s.	(b) n.s.	(b) n.s.	(a) n.s.
Carioca 80	36,3 ± 9,9	8,1 ± 3,2	6,9 ± 3,9	3,1 ± 1,1	
Carioca 80 ²	37,0 ± 1,5	8,4 ± 0,2	7,8 ± 0,5	3,5 ± 0,3	
	(b) n.s.	(c) n.s.	(c) n.s.	(c) n.s.	(b) n.s.
Aprotéica	30,7 ± 4,8	2,6 ± 0,8	-2,9 ± 1,0	0,8 ± 0,4	
Aprotéica ²	24,2 ± 0,6	1,6 ± 0,1	-2,2 ± 1,3	0,6 ± 0,2	

(1) - Os resultados representam a média para 4 ratos, pesando 66,9 ± 1,8 g, após jejum de 16 horas, a adaptação de dois dias às dietas

(2) - Ratos controle que não foram injetados com ³H-adenosina.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem (p < 0,05)

(n.s.) - Não significativo em relação aos ratos controle.

tro fator confirmado pelos resultados é que o consumo da dieta de caseína por rato é significativamente ($p < 0,05$) maior do que a de feijão. Esta última quantidade chegou até a não ser diferente da consumida pelos ratos em dieta aprotéica nos ensaios A e D. As variações no peso dos animais no ensaio A (Tabela 5) e no ensaio D (Tabela 8), ficaram dentro do esperado, estando de acordo com os resultados encontrados por Durigan (1985). As variações de peso no ensaio B (Tabela 6) e no ensaio C (Tabela 7) ficaram abaixo do esperado. Além disso, nos ratos do ensaio C, foi observada retenção urinária. No ensaio B, a secagem da farinha integral do feijão cozido, em secador, pode ter causado reações indesejáveis, como reações tipo Maillard, baixando o valor nutritivo da proteína da dieta (Oliveira, 1977).

Visto que em todos os ensaios, os ganhos de peso dos ratos nas dietas de feijão (Tabelas 5, 6, 7, 8) não correspondiam aos valores biológicos relativamente altos (Tabelas 9, 10, 11, 12) destes cultivares, chegando até a não apresentar diferenças significativas com o valor biológico da dieta de caseína nos ensaios A (Tabela 9) e C (Tabela 11), determinou-se as correlações entre variação do peso e nitrogênio retido. As regressões foram calculadas com ajuste linear para todos os dados em cada ensaio. Os coeficientes de correlação obtidos foram: $r = 0,9642$ para ensaio A, $r = 0,8610$ para B, $r = 0,9192$ para C e $r = 0,9516$ para D. A as-

sociação direta entre nitrogênio retido e as variações de peso, apresentou um valor de F significativo para os ensaios A, B, C ($p < 0,001$) e para o ensaio D ($p < 0,004$), implicando na rejeição da hipótese de nulidade de B. Portanto, o modelo ficou $y = B_0 + BX$. Na procura de observações que estariam fora das amostras estudadas, o teste de Cook não evidenciou a presença de "outliers" em nenhum dos ensaios. Isto demonstrou que poder-se-ia obter o ajuste linear com seus respectivos coeficientes. O modelo ajustado para os ensaios A, B, C e D foram $Y = -10,8326 + 0,0442X$, $Y = -12,0501 + 0,0306X$, $Y = -9,9799 + 0,0279X$ e $Y = -4,1447 + 0,0309X$, respectivamente. Existindo uma correlação forte e positiva em cada ensaio, calculou-se esta correlação para os dados dos 4 ensaios, em conjunto, obtendo-se coeficiente de correlação $r = 0,83309$ ($p < 0,0001$). O ajuste linear obtido está apresentado com o seu respectivo diagrama de dispersão na Figura 1.

Analisando o nitrogênio fecal e nitrogênio urinário totais excretados pelos ratos nas diferentes dietas (Tabelas 9, 10, 11 e 12), observou-se que não há diferença significativa entre os dois cultivares de feijão, porém os ratos em dieta de feijão excretaram uma quantidade de nitrogênio fecal significativamente maior ($p < 0,005$) do que os ratos em dieta de caseína e aprotéica. Este aumento de nitrogênio fecal dos ratos em dieta de feijão foi compensado pela diminuição de nitrogênio urinário nos ensaios A e C (Tabelas

9 e 11) de forma que o balanço de nitrogênio foi semelhante. Esta observação foi feita por Fairweather-Tait (1983), e algo similar foi relatado quando se alimentaram animais com dietas ricas em vários tipos de polissacarídeos, especialmente goma guar e goma de feijão carbo (Harmuth-Hoene & Schwerdtfeger, 1979). Uma correlação negativa entre excreção de nitrogênio urinário e nitrogênio fecal foi também relatado em humanos alimentados com dieta contendo diferentes tipos de fibra (Cornu & Delpeuch, 1981). Este efeito não foi confirmado pelos resultados dos ensaios B e D e nem sustentado por outros autores que mediram o nitrogênio fecal e urinário de ratos em dieta de feijão (Oliveira, 1986).

Os resultados obtidos nos ensaios A, B, C e D para digestibilidade aparente e verdadeira e os de valor biológico aparente e verdadeiro estão dispostos nas Tabelas 9, 10, 11 e 12. Pelas Tabelas 9 e 12 pode ser observado que a injeção de aminoácidos tritiados (^3H -arginina) e nucleosídeo tritiado (^3H -adenosina) não modificaram a utilização da caseína e da proteína de feijão pelos ratos. A digestibilidade aparente e verdadeira da caseína comercial nos quatro ensaios apresentaram valores semelhantes, superiores a 90%, estando de acordo com aqueles já amplamente divulgados na literatura (Puztai et alii, 1979; Wolzak et alii, 1981; Oliveira, 1986; Tezoto & Sgarbieri, 1990). A digestibilidade aparente e verdadeira do cultivar Carioca 80 foi semelhante

nos três ensaios A, C e D (Tabelas 9,11 e 12) e do cultivar Aeté 3 nos ensaios A e C (Tabelas 9 e 11). Calculando-se a média das médias obtidas em cada ensaio teremos valores de $73,4 \pm 2,9\%$ e $76,1 \pm 2,6\%$ para digestibilidade aparente e verdadeira de Carioca 80 e $69,7 \pm 1,0\%$ e $73,1 \pm 0,3\%$ para Aeté 3. A magnitude dos desvios-padrão mostra que os resultados foram homogêneos. Valores estes que ficaram na faixa de médias relatadas na literatura (Domene, 1990). Nota-se em todos os ensaios que a digestibilidade aparente e verdadeira dos dois cultivares de feijão não diferiram entre si ($p < 0,05$); porém, como já constatado na literatura (Oliveira, 1986; Lanfer Marques & Lajolo, 1988; Tezoto & Sgarbieri, 1990) diferiram significativamente da digestibilidades aparente e verdadeira da caseína. O valor mais baixo encontrado para os dois cultivares de feijão no ensaio B (Tabela 10) pode ser explicado pelo modo de preparação da farinha de feijão e pela idade dos ratos. Na literatura encontram-se referências (Bender & Mohamadiha, 1981) de que o feijão cozido tem uma digestibilidade menor em ratos maiores.

Quanto ao valor biológico aparente e verdadeiro da caseína e dos dois cultivares de feijão, os resultados obtidos nos ensaios A, B e D apresentaram valores semelhantes. As médias do valor biológico calculadas a partir dos resul-

TABELA 9. Ensaio A. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, valores biológicos aparentes e verdadeiros, em ratos¹ Wistar previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 uCi de ³H-Arg, e colocados em dieta contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas (11,50 ± 1,0%), e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados

Dieta	N Ingerido NI (mg)	N Fecal NF (mg)	N. Urinário NU (mg)	N Retido NI - (NF + NU) NR (mg)	Digestibilidade		Valor Biológico	
					Aparente (%)	Verdadeira (%)	Aparente (%)	Verdadeiro (%)
	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Caseína	1199,2 ± 86,2	95,2 ± 25,6	224,4 ± 60,7	879,6 ± 19,17	92,2 ± 1,7	94,3 ± 1,7	79,8 ± 4,4	85,5 ± 4,6
Caseína ²	1130,0 ± 144,2	103,8 ± 6,4	256,9 ± 47,9	769,3 ± 90,6	90,8 ± 0,6	90,8 ± 0,5	75,1 ± 0,9	80,2 ± 1,7
	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Carioca 80	704,7 ± 82,0	218,9 ± 32,0	146,0 ± 44,2	339,4 ± 77,9	68,5 ± 5,6	72,1 ± 5,2	69,8 ± 6,9	82,4 ± 7,0
Carioca 80 ²	749,9 ± 113,3	197,5 ± 37,7	152,7 ± 36,9	399,3 ± 143,4	73,5 ± 3,6	76,3 ± 3,5	72,9 ± 11,3	82,7 ± 8,9
	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(a)
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Aeté 3	691,5 ± 124,3	207,9 ± 40,6	149,9 ± 43,7	337,7 ± 39,1	69,2 ± 2,7	73,3 ± 2,6	69,2 ± 5,1	82,7 ± 5,9
Aeté 3 ²	626,3 ± 77,2	192,1 ± 15,9	135,1 ± 27,9	299,0 ± 73,9	69,1 ± 1,98	72,8 ± 2,6	68,2 ± 8,3	83,1 ± 6,5
		(c)	(c)					
		s.						
Aprotéica		25,2 ± 3,07	59,3 ± 15,6					
Aprotéica ²		14,9 ± 5,5						

(1) - Os resultados representam a média para 3 ratos em controle e 5 ratos em ensaio, pesando 69,5 ± 8,5 g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas durante 2 dias

(2) - Ratos controle que não foram injetados com ³H-Arg.

(a,b,c) - valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não difere (p < 0,05)

(n.s.) - não significativa em relação aos ratos controle.

(s.) - diferença significativa (p < 0,02) em relação aos ratos controle.

TABELA 10. Ensaio B. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, valores biológicos aparentes e verdadeiros, em ratos¹ Wistar previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 42 μ Ci de ³H-6ly, e colocados em dieta contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas (11,0 \pm 0,2%), e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias.

Dieta	N Ingerido NI (mg)	N Fecal NF (mg)	N. Urinário NU (mg)	N Retido NI - (NF + NU) NR (mg)	Digestibilidade		Valor Biológico	
					Aparente (%)	Verdadeira (%)	Aparente (%)	Verdadeiro (%)
Caseína	1014,8 \pm 91,0 (a)	75,5 \pm 16,6 (a)	154,0 \pm 39,5 (a)	785,1 \pm 65,3 (a)	92,5 \pm 1,9 (a)	95,7 \pm 1,8 (a)	83,7 \pm 2,9 (a)	90,5 \pm 3,2 (a)
Carioca 80	902,0 \pm 152,3 (b)	370,3 \pm 79,4 (b)	175,9 \pm 19,8 (b)	355,8 \pm 131,9 (b)	58,9 \pm 12,1 (b)	62,5 \pm 11,8 (b)	56,9 \pm 6,5 (b)	80,5 \pm 3,0 (b)
Aeté 3	783,1 \pm 136,6 (b)	333,3 \pm 22,5 (b)	171,6 \pm 44,3 (b)	278,3 \pm 96,7 (b)	57,4 \pm 6,9 (b)	60,5 \pm 5,2 (b)	61,4 \pm 7,4 (b)	76,8 \pm 6,9 (b)
Aprotéica		33,2 \pm 4,4 (a)	58,5 \pm 30,4 (b)					

(1) - Os resultados representam a média para 4 ratos, pesando 167,3 \pm 7,3 g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas durante dois dias

(a,b,c) - valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem ($p < 0,05$)

TABELA 11. Ensaio C. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 45 uCi de ^3H -Leu, e colocados em dieta contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas ($11,3 \pm 0,6\%$), e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias

Dieta	N Ingerido NI (mg)	N Fecal NF (mg)	Digestibilidade	
			Aparente (%)	Verdadeira (%)
Caseína	883,4 \pm 144,4 (a)	77,1 \pm 15,1 (a)	91,1 \pm 2,3 (a)	92,8 \pm 2,1 (a)
Carioca 80	577,3 \pm 83,4 (b)	138,8 \pm 39,1 (b)	76,1 \pm 5,5 (b)	78,6 \pm 5,6 (b)
Aeté 3	665,9 \pm 173,7 (b)	194,2 \pm 60,7 (c)	70,9 \pm 4,7 (b)	73,2 \pm 4,8 (b)
Aprotéica		14,2 \pm 4,2 (d)		

(1) - Os resultados representam a média para 6 ratos, pesando 79,3 \pm 6,6 g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas, durante 2 dias.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem ($p < 0,05$)

TABELA 12. Ensaio D. Balanço de nitrogênio, digestibilidades aparentes e verdadeiras, valores biológicos aparentes e verdadeiros, em ratos Wistar previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μ Ci de 3 H-adenosina, e colocados em dieta contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e caseína, como fontes protéicas ($10,8 \pm 0,9\%$), e aprotéica, ao fim de balanço de 4 dias, em comparação com ratos não injetados.

Dieta	N Ingerido NI (mg)	N Fecal NF (mg)	N. Urinário NU (mg)	N Retido NI - (NF + NU) NR (mg)	Digestibilidade		Valor Biológico	
					Aparente (%)	Verdadeira (%)	Aparente (%)	Verdadeiro (%)
	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Caseína	869,5 \pm 124,8	68,1 \pm 15,5	121,7 \pm 23,4	681,6 \pm 110,87	92,1 \pm 1,1	94,0 \pm 1,1	84,8 \pm 0,5	88,8 \pm 1,26
Caseína ²	902,1 \pm 48,9	63,8 \pm 0,8	107,5 \pm 26,1	730,4 \pm 74,2	93,0 \pm 0,2	94,6 \pm 0,2	87,1 \pm 3,8	89,7 \pm 3,5
	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Carioca 80	638,4 \pm 134,8	157,0 \pm 42,9	116,7 \pm 13,6	364,6 \pm 127,9	75,3 \pm 1,5	78,0 \pm 1,6	75,5 \pm 6,7	81,4 \pm 4,8
Carioca 50 ²	651,2 \pm 27,4	164,8 \pm 7,4	101,0 \pm 16,9	385,0 \pm 36,9	74,5 \pm 0,0	75,1 \pm 0,1	78,9 \pm 4,4	85,2 \pm 4,0
		(c)	(c)					
		n.s.	n.s.					
Aprotéica		16,2 \pm 8,1	29,2 \pm 9,3					
Aprotéica ²		10,6 \pm 4,4	29,0 \pm 1,4					

(1) - Os resultados representam a média para 2 ratos em controle e 4 ratos em experimento, pesando $66,9 \pm 7,8$ g, após jejum de 16 horas e adaptação de dois dias às dietas.

(2) - Ratos que não foram injetados com 3 H-adenosina.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem ($p < 0,05$).

(n.s.) - não significativa em relação aos ratos controle.

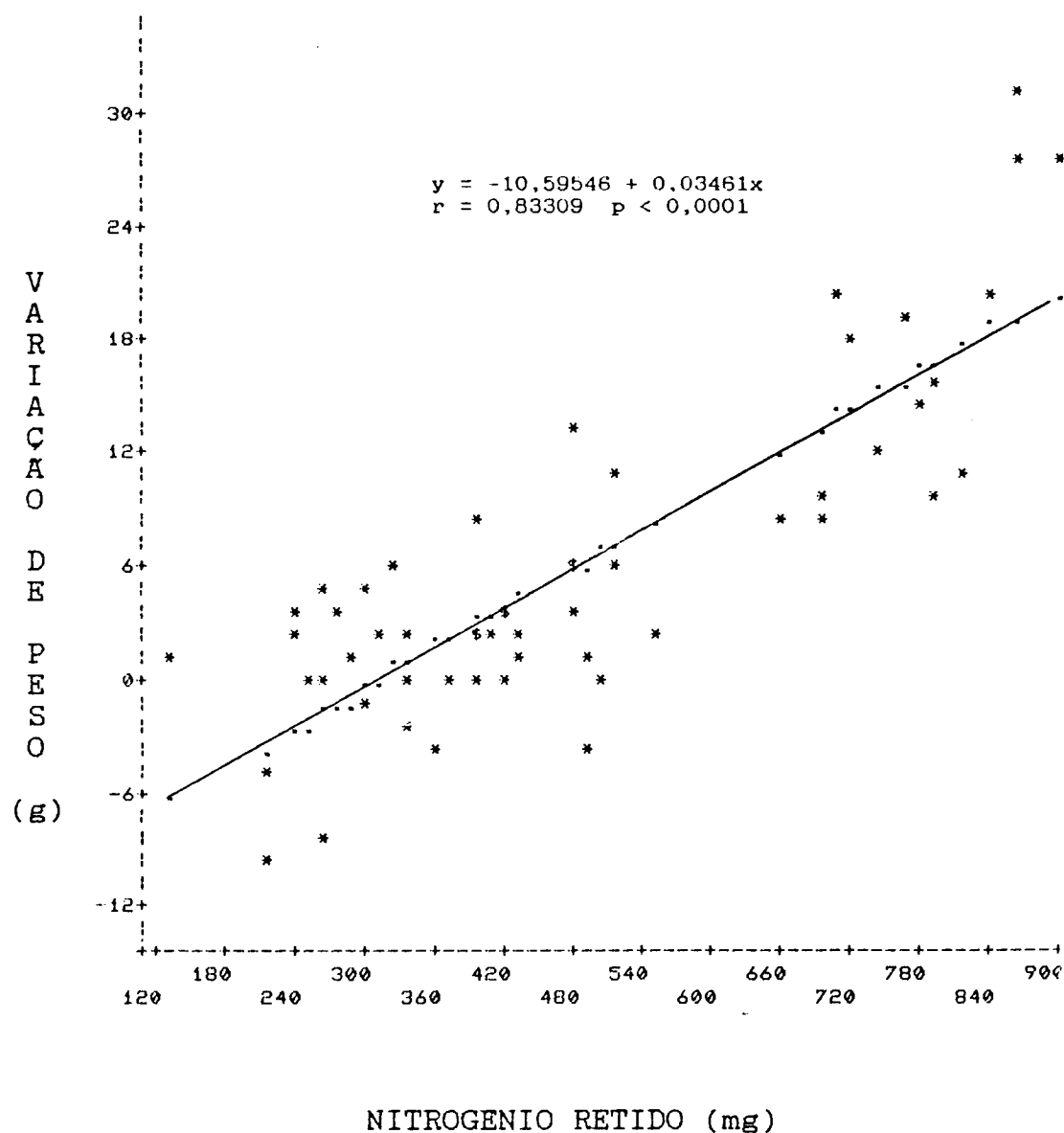


FIGURA 1. Regressão linear para a relação entre a variação de peso e nitrogênio retido em ratos previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μCi de ^3H -Arg, 42 μCi ^3H -Gly, 45 μCi ^3H -Leu ou 50 μCi ^3H -adenosina após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3, e aprotéica.

tados dos ensaios A, B e D (Tabelas 9, 10 e 12) para caseína, Carioca 80 e Aeté 3 foram respectivamente para os aparentes, $82,6 \pm 5,4\%$, $72,1 \pm 6,0\%$ e $67,0 \pm 2,9\%$ e para os verdadeiros, $87,2 \pm 3,9\%$, $82,7 \pm 1,8\%$ e $80,4 \pm 4,4\%$. Em todos os casos um desvio padrão na faixa daqueles obtidos em cada ensaio individual. Estes resultados mostraram-se levemente inferiores aos encontrados por Tezoto e Sgarbieri (1990), e levemente superiores aos de Domene (1990). Os cálculos estatísticos demonstraram, nos três ensaios, que ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores biológicos aparentes da caseína e dos cultivares de feijão. Entretanto para valores biológicos verdadeiros, os ensaios não foram confirmativos, pois os resultados permitiram interpretações diferentes em relação à análise estatística. Enquanto no ensaio A (Tabela 9) os valores biológicos verdadeiros da caseína e dos cultivares de feijão não diferiram ($p < 0,05$), nos ensaios B e D (Tabelas 9 e 12) passaram a diferir. Esta divergência também é observada na literatura, onde ao mesmo tempo que Oliveira (1986) e Domene (1990) relatam que valores biológicos da caseína não diferem dos de feijão, os resultados de Tezoto e Sgarbieri (1990) confirmam uma diferença significativa ($p < 0,05$).

O acompanhamento da dieta consumida, da variação do peso, da determinação de balanço de nitrogênio e dos cálculos da digestibilidade e valor biológico, serviram como um

monitoramento para análise mais confiável dos resultados mostrados a seguir.

Através dos valores dispostos nas Tabelas 9, 10, 11 e 12 referentes ao nitrogênio fecal excretado pelos ratos mantidos nas dietas de feijão e de caseína, observa-se que não há diferença significativa entre nitrogênio fecal referente aos dois cultivares de feijão. Assim, calculou-se a proporção entre a excreção referente às médias dos dois cultivares de feijão e da caseína, obtendo-se para os ensaios A, B, C e D valores iguais a 2,2; 4,6; 2,2 e 2,6 respectivamente. O valor obtido no ensaio B não tem efeito comparativo com os outros ensaios, por motivos já mencionados. Na literatura existe diversidade com relação ao registro desta proporção, encontrando-se valores de 2,5; 2,7; 3,0; 3,9; e 4,4; respectivamente por Fairweather-Tait (1983), trabalhando com cultivar "white kidney" e ratos adultos com um dia de adaptação com a dieta; Oliveira (1986a), usando o feijão Carioca 80 e ratos em crescimento e com dois dias de adaptação; Lanfer Marques (1986), trabalhando com cv. Carioca e ratos em crescimento com 3 dias de adaptação; Domene (1990), usando cv. Aroana 80 com ratos em crescimento e dois dias de adaptação; Oliveira e Sgarbieri (1986a), com feijão Carioca 80 e ratos em crescimento sem adaptação à dieta. Nestes estudos, além do cultivar do feijão, idade dos animais e o tempo de adaptação à dieta, outro fator variável foi o modo

de preparação da farinha integral cozida. Como cada ensaio tem suas peculiaridades, não podemos definir fatores que definitivamente contribuíram para esta divergência. Ao se tentar justificar o alto valor 4,4 obtido por Oliveira (1986) por não adaptação dos ratos e o valor 4,6 obtido no ensaio B, devido ao modo de preparação e idade dos ratos, nenhum destes fatores responderiam pelo alto valor 3,9 obtido por Domene (1990). Quando analisamos as condições experimentais e o valor obtido por Fairweather-Tait (1983) e o ensaio B deste trabalho, torna-se ainda menos compreensível o fator predominante no controle da excreção de nitrogênio fecal e o motivo desta divergência nos resultados. Pois, com uma condição próxima, exceto do cultivar, ao ensaio B, a proporção obtida por este autor é comparativamente baixa, igual a 2,5. A condição de trabalho que mais se aproximou ao ensaio A e C foi a de Oliveira (1986) que obteve o valor 2,7.

Esta grande quantidade de nitrogênio fecal excretado pelos ratos nas dietas de feijão cozido, conforme demonstrado pelas proporções encontradas com relação aos ratos em dieta de caseína, pode ser discutida à luz dos fatos apresentados na revisão da literatura.

A baixa susceptibilidade de proteínas de feijão à hidrólise enzimática, revisada por vários autores (Romero & Ryan, 1978; Liener & Thompson, 1980; Chang & Satterlee,

1981) atribuída ao impedimento estrutural, à estrutura compacta e a sua estrutura dimensional, entretanto, não pode ser, após cozimento, responsável por esta grande excreção de nitrogênio fecal, pois foi mostrado repetidamente que proteínas isoladas de feijão após tratamento térmico, tornam-se digeríveis *in vitro* (Romero & Ryan, 1978; Brandbear & Boulter, 1984; Oliveira, 1986; Deshpande & Nielsen, 1987a). A grande excreção de nitrogênio fecal devido à ingestão de feijão integral cozido foi atribuído aos componentes do feijão capazes de interagirem com suas proteínas ou ocorrência de mecanismo ao nível intestinal que leva a complexos protéicos indigeríveis e/ou estimulam o aumento das secreções de nitrogênio endógeno. Neste sentido, os fatores antinutricionais não foram detectados no feijão cozido. Contudo, estes antinutrientes, mesmo após tratamento térmico, de uma maneira ou outra, foram considerados responsáveis pelo aumento de nitrogênio fecal, tanto endógeno como exógeno, e baixa digestibilidade das frações protéicas (Lanfer Marques & Lajolo, 1986) e de feijão integral, como fonte protéica, (Durigan, 1985). Outros componentes resistentes ao calor são ácido fítico (Deshpande et alii, 1982)) e taninos que podem formar complexos com proteína (Bressani e Elias, 1980) e serem estimulantes fortes para secreções pancreáticas. Uma observação deve ser feita em relação aos carboidratos do feijão, pois o aumento significativo na perda de nitrogênio fecal foi observado ao aumentar os polissacarídeos da dieta

humana (Harmuth-Hoene & Schwerdtfeger, 1976; Normani et alii, 1979; Normani et alii, 1990). Muitas vezes foi sugerido que este aumento é derivado de fonte endógena (Southgate & Durnin, 1970; Walker, 1975). O efeito das fibras sobre o aumento da atividade de microorganismos como fonte de nitrogênio fecal, também foi objeto de vários estudos (Schwerdtfeger, 1979). Apesar dos estudos expostos, ainda não está bem elucidado os mecanismos pelos quais a ingestão de feijão altera os processos metabólicos de secreção enzimática, descamação da mucosa intestinal, digestão e absorção no aparelho digestivo.

4.3 Ensaio com aminoácidos marcados com trítio

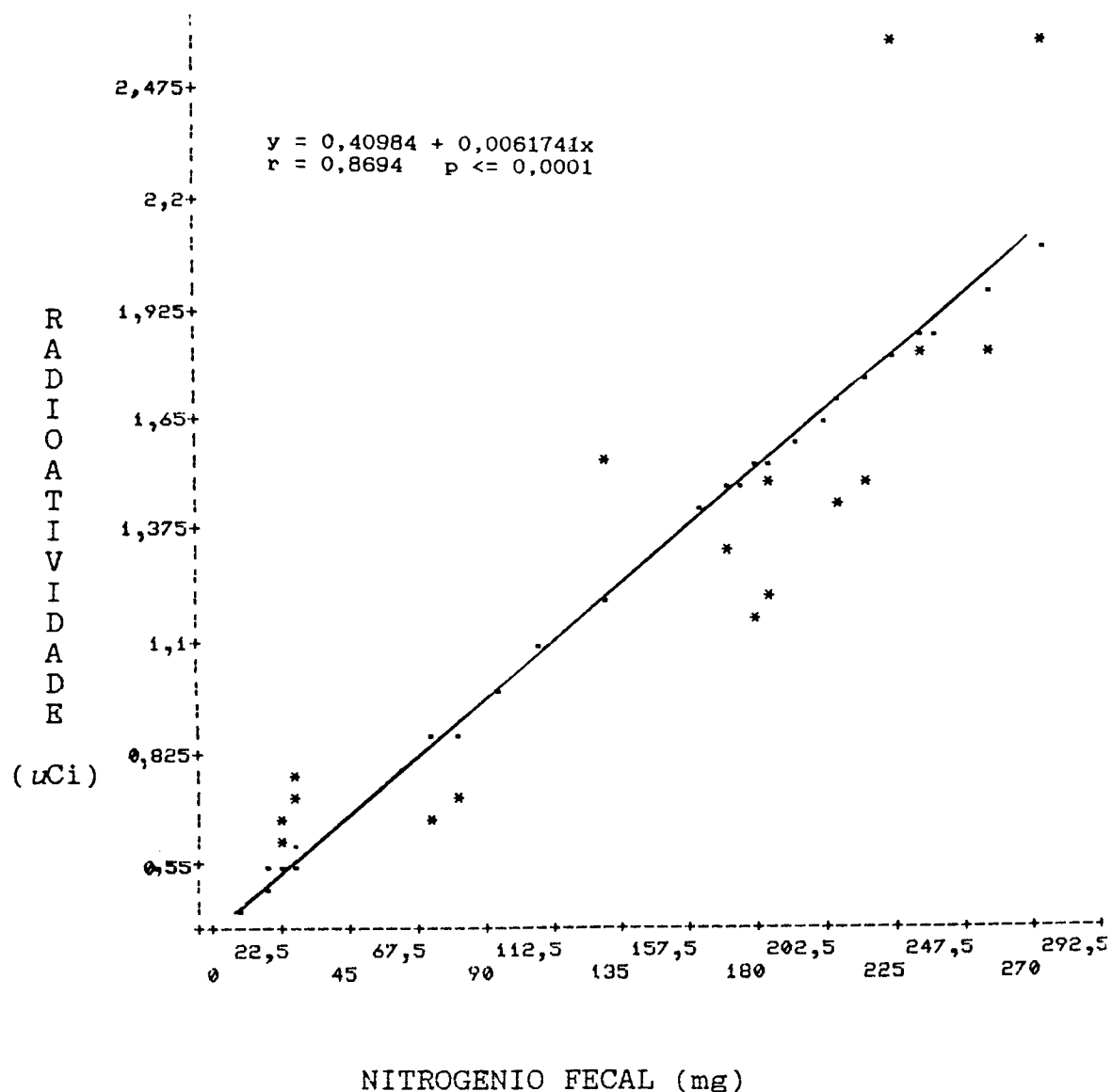
Nas Tabelas 13, 14 e 15, observa-se que as médias das radioatividades das fezes dos ratos nas dietas de feijão não diferem entre os dois cultivares. Enquanto na dieta com Carioca 80, nos três ensaios, a radioatividade diferiu ($p < 0,05$) da dieta de caseína e da aprotéica, na dieta contendo Aeté 3 a radioatividade das fezes dos ratos, ainda que sempre maior, não diferiu daquelas obtidas na dieta de caseína nos ensaios A e B, diferindo no ensaio C. Com relação à dieta aprotéica, o cultivar Aeté 3 diferiu nos ensaios A e C não tendo diferido no ensaio B ($p < 0,05$). Os resultados não homogêneos do grupo aprotéico demonstrado pelo desvio-padrão

maior no ensaio B do que os obtidos no grupo aprotéico dos ensaios A e C, pode ser uma desvantagem do uso de ^3H -glicina em relação aos outros dois aminoácidos utilizados.

Certamente quando um aminoácido marcado é injetado, de acordo com a fisiologia normal do organismo ele entra no "pool" metabólico de aminoácidos. Contudo, quando um aminoácido marcado é injetado em ensaio biológico, há que se considerar que, a rigor, os padrões de excreção do isótopo refletem aspectos particulares do seu metabolismo. Neste sentido, ^3H -glicina participa na síntese de vários produtos específicos e há diversas vias pelas quais pode chegar ao conteúdo intestinal. Participa na síntese de nucleotídeos purínicos e assim faz parte de células em formação do intestino delgado, sendo conseqüentemente excretada no intestino devido a descamação celular, e também sob forma conjugada com ácido cólico formando glicolato. E também precursor das porfirinas que fazem parte do grupo heme da hemoglobina, que na sua degradação produz pigmentos biliares, que são secretados juntos com a bile no intestino. Enquanto que no caso de leucina e arginina, uma única via de serem secretados no intestino é sob forma de aminoácido livre, peptídeos, proteínas ou seus catabólitos. Miller, apud Shenkin (1978), inferiu que a leucina não é transformada no fígado e passa para a circulação geral para ser metabolizada principalmente no músculo e nos rins. Este pode ser o motivo de menor incorpo-

ração da radioatividade encontrada no intestino do grupo de ratos que receberam a injeção de ^3H -leucina em relação com o que receberam ^3H -arginina (Tabela 17 e Figuras 8 e 9). Contudo Nasset (1964) mostrou valores quase iguais de moles de arginina e de Leucina no conteúdo de jejuno de ratos alimentados com dieta aprotéica. A análise da correlação entre radioatividades e nitrogênios fecais e os modelos ajustados mostram a peculiaridade de cada aminoácido injetado. O modelo ajustado para cada ensaio está apresentado junto com seus diagramas de dispersão nas Figuras 2, 3 e 4, havendo sempre correlações lineares positivas e moderadas com valores iguais a $r = 0,8694$ ($p < 0,001$), $r = 0,7212$ ($p < 0,003$) e $r = 0,7708$ ($p < 0,001$), respectivamente para os ensaios A, B e C. Calculando o valor da fração BX do modelo ajustado $Y = B_0 + BX$ em cada ensaio, e sua percentagem em relação à radioatividade total, obteve-se respectivamente os valores de 60,5; 77,9 e 22,7% para caseína, feijão e aprotéica para ensaio A e 9,7; 33,6 e 5,0% para ensaio B e 36,8; 51,5 e 10,2% para ensaio C. Assim, parece que a ^3H -arginina funcionou como marcador mais apropriado, em comparação com leucina e especialmente com ^3H -glicina pois a quantidade de radioatividade que chegou às fezes ligada ao nitrogênio era maior.

Os valores de nitrogênio endógeno, calculados a partir dos dados dos nitrogênios fecais e radioatividades



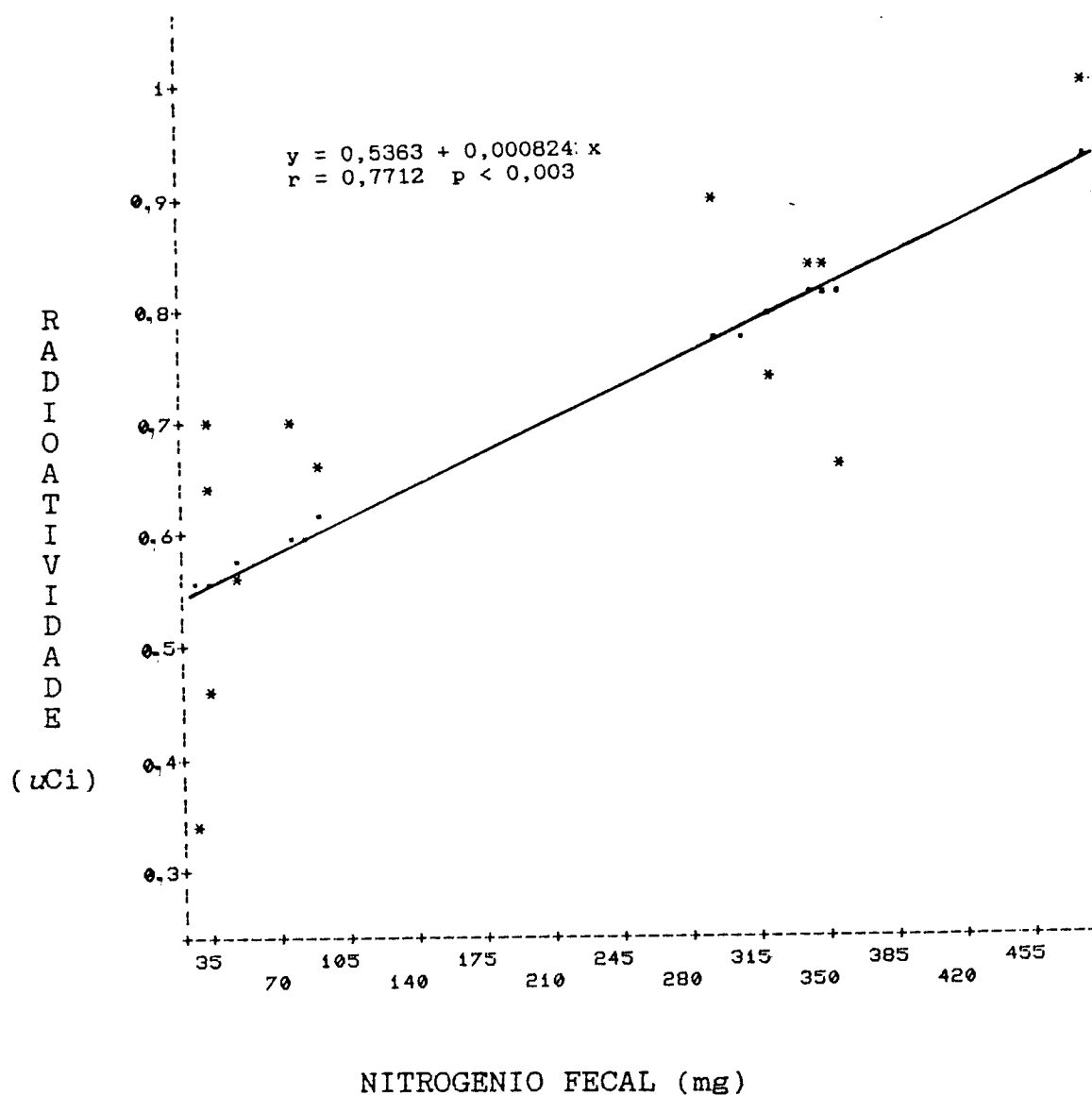


FIGURA 3. Regressão linear para a relação entre radioatividade das fezes (uCi) e nitrogênio fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 42 uCi de ^3H -Gly, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e aprotéica.

referentes às dietas de caseína e cultivares de feijão, bem como os decorrentes da dieta aprotéica, estão apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15. Observa-se em todos os ensaios o aumento da excreção de nitrogênio endógeno nos ratos em dieta de caseína, Carioca 80 e Aeté 3, em relação ao grupo aprotéico, não sendo significativo para o primeiro e significativo ($p < 0,05$) para os dois últimos. Calculando a percentagem deste aumento obteve-se valores iguais a 42,5, 162,6 e 133,3% no ensaio A; 18,4, 68,5 e 37,0% no ensaio B e 50,8, 147,2 e 142,0% no ensaio C, respectivamente para caseína, Carioca 80 e Aeté 3. Como nota-se, este aumento no ensaio B é bem menor. Este fato, em parte, é relacionado com o aumento do nitrogênio fecal no grupo aprotéico, que por sua vez é devido à idade dos ratos neste ensaio, e que não foi acompanhado na mesma proporção por aumento da radioatividade, quando comparado com os ensaios A e C. Outro ponto a refletir é que o coeficiente de variação encontrado para a radioatividade do grupo aprotéico neste ensaio é 37%, enquanto no ensaio A é 9% e no C é 14%. De qualquer maneira, como já referido, a ^3H -glicina mostrou-se o aminoácido menos apropriado para incorporação às proteínas secretadas, e, por consequência, trazer a radioatividade para o lúmen intestinal.

O aumento do nitrogênio endógeno fecal dos ratos nas dietas contendo feijão em relação à dieta aprotéica nos

TABELA 13. Radioatividade de fezes e urina, nitrogênio endógeno fecal e digestibilidade real em ratos¹ Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μ Ci de ³H-Arg, para dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas (11,5 \pm 1,0%) ao fim de balanço de 4 dias

Dieta	Radioatividade		Nitrog. Endógen.	Digestibilidade
	Fezes (μ Ci)	Urina (μ Ci)	Fezes (μ g)	Real (%)
Caseína	0,97 \pm 0,51 (ac)	3,39 \pm 0,66 (ab)	35,9 \pm 18,9 (ac)	95,1 \pm 0,8 (a)
Carioca 80	1,79 \pm 0,50 (b)	2,20 \pm 0,44 (a)	66,2 \pm 18,4 (b)	78,1 \pm 4,8 (b)
Aeté 3	1,59 \pm 0,58 (ab)	4,18 \pm 0,52 (b)	58,8 \pm 21,5 (ab)	78,3 \pm 1,6 (b)
Aprotéica	0,68 \pm 0,06 (c)	3,40 \pm 0,47 (ab)	25,2 \pm 3,07 (c)	

(1) - Os resultados representam a média para 5 ratos, pesando 69,5 \pm 8,5 g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas durante 2 dias.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra não diferem ($p < 0,05$)

TABELA 14. Radioatividade de fezes e urina, nitrogênio endógeno fecal e digestibilidade em ratos¹ Mistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 42 μ Ci de ³H-6ly, para dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas (11.0 \pm 0,2%) ao fim de balanço de 4 dias.

Dieta	Radioatividade		Nitrog. Endógen.	Digestibilidade
	Fezes (μ Ci)	Urina (μ Ci)	Fezes (mg)	Real (%)
Caseína	0,64 \pm 0,09 (a)	2,31 \pm 1,50 (a)	39,1 \pm 4,4 (ac)	96,5 \pm 1,8 (a)
Carioca 80	0,91 \pm 0,09 (b)	2,70 \pm 0,9 (a)	55,6 \pm 5,2 (b)	67,0 \pm 11,3 (b)
Aeté 3	0,74 \pm 0,09 (ab)	2,81 \pm 1,3 (a)	45,2 \pm 5,2 (a)	62,7 \pm 5,3 (b)
Aprotéica	0,54 \pm 0,17 (a)	3,91 \pm 1,59 (a)	33,0 \pm 4,4 (c)	

(1) - Os resultados representam a média para 4 ratos, pesando 167,3 \pm 15,8 g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas, durante 2 dias.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra não diferem ($p < 0,05$)

TABELA 15. Radioatividade de fezes e nitrogênio endógeno fecal e digestibilidade real em ratos¹ Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 45 μCi ^3H -Leu, para dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e caseína, como fontes protéicas ($11,3 \pm 0,6\%$) ao fim de balanço de 4 dias

Dieta	Radioatividade	Nitrogênio Endógeno	Digestibilidade
	Fezes (μCi)	Fezes (mg)	Real (%)
Caseína	$0,54 \pm 0,05$ (a)	$21,4 \pm 2,0$ (a)	$93,6 \pm 2,1$ (a)
Carioca 80	$0,89 \pm 0,35$ (b)	$35,2 \pm 5,5$ (b)	$82,1 \pm 4,6$ (b)
Aeté 3	$0,87 \pm 0,22$ (b)	$34,4 \pm 9,0$ (b)	$76,3 \pm 4,9$ (c)
Aprotéica	$0,36 \pm 0,05$ (a)	$14,2 \pm 4,2$ (a)	

(1) - Os resultados representam a média para 6 ratos, pesando $79,3 \pm 6,6$ g, após jejum de 16 horas e adaptação às dietas, durante 2 dias.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem ($p < 0,05$)

ensaios A e C, é semelhante ao encontrado por Domene (1990), que trabalhou com feijão marcado com ^{15}N e encontrou uma excreção de material endógeno fecal referente à dieta de feijão-comum, 150% maior do que referente à dieta aprotéica.

Calculando a partir dos dados das Tabelas 9,10 e 11 a percentagem de nitrogênio fecal em relação ao ingerido, encontram-se, respectivamente, para caseína, Carioca 80 e Aeté 3, os valores de 7,9, 31,0 e 30,0% no ensaio A e 8,7, 24,0 e 29,2% no ensaio C. Calculando-se a partir das nitrogênios fecal e endógeno (Tabelas 9,10,11,13 14 e 15), a percentagem de nitrogênio endógeno no nitrogênio fecal, observa-se que, em média, para a dieta de caseína 32,7% de nitrogênio fecal é de origem endógena 67,3% é de origem exógena. A mesma observação referente a Carioca 80, 27,9% é de origem endógena e 72,1% é de origem exógena e para Aeté 3, 23,0% é de endógeno e 77,0% exógeno. Nota-se que a proporção da percentagem de nitrogênio endógeno para nitrogênio exógeno, na caseína e nos cultivares de feijão é muito próxima, ou seja, o aumento de nitrogênio endógeno nas fezes era proporcional ao nitrogênio fecal excretado. A mesma conclusão pode ser observada no ensaio A, quando determinou-se a radioatividade ($\mu\text{Ci/g}$) do conteúdo do intestino grosso (Tabela 16). Estes valores foram muito similares para os ratos em dieta de caseína e na dieta de feijão Carioca 80, nos períodos de 6, 24, 48, 72 e 98 horas. Isto demonstra que a excre-

ção de radioatividade nas fezes dos dois grupos ocorreu numa proporção constante, função do peso das fezes de cada rato. O aumento de radioatividade observado nas fezes (Tabelas 13, 14 e 15), dos ratos em dieta de feijão em relação à caseína é quase proporcional ao peso das fezes (Tabelas 5, 6 e 7) e conseqüentemente ao nitrogênio fecal.

Os valores da radioatividade das urinas não mostraram resultados conclusivos, pois como os aminoácidos estavam marcados em seus esqueletos carbônicos, não eram marcadores apropriados do nitrogênio urinário. Assim, não encontrou-se correlação entre radioatividade das urinas e nitrogênio urinário.

Procurou-se determinar as correlações existentes entre a digestibilidade aparente com a quantidade de nitrogênio endógeno fecal, encontrando-se respectivamente uma correlação linear negativa e moderada com $r = -0,6240$, ($p < 0,02$) para o ensaio A (Figura 5) e uma correlação linear negativa e moderada $r = -0,7240$, ($p < 0,03$) para o ensaio B (Figura 6). No ensaio C (Figura 7), a correlação linear foi negativa e forte com $r = -0,9523$, ($p < 0,004$). O modelo ajustado para cada ensaio está sendo apresentado junto com seu diagrama de dispersão. Demonstrou-se desta forma que a excreção fecal de nitrogênio endógeno dos ratos influi na redução dos valores da digestibilidade aparente das proteínas de feijão. O uso da marcação isotópica para correção da

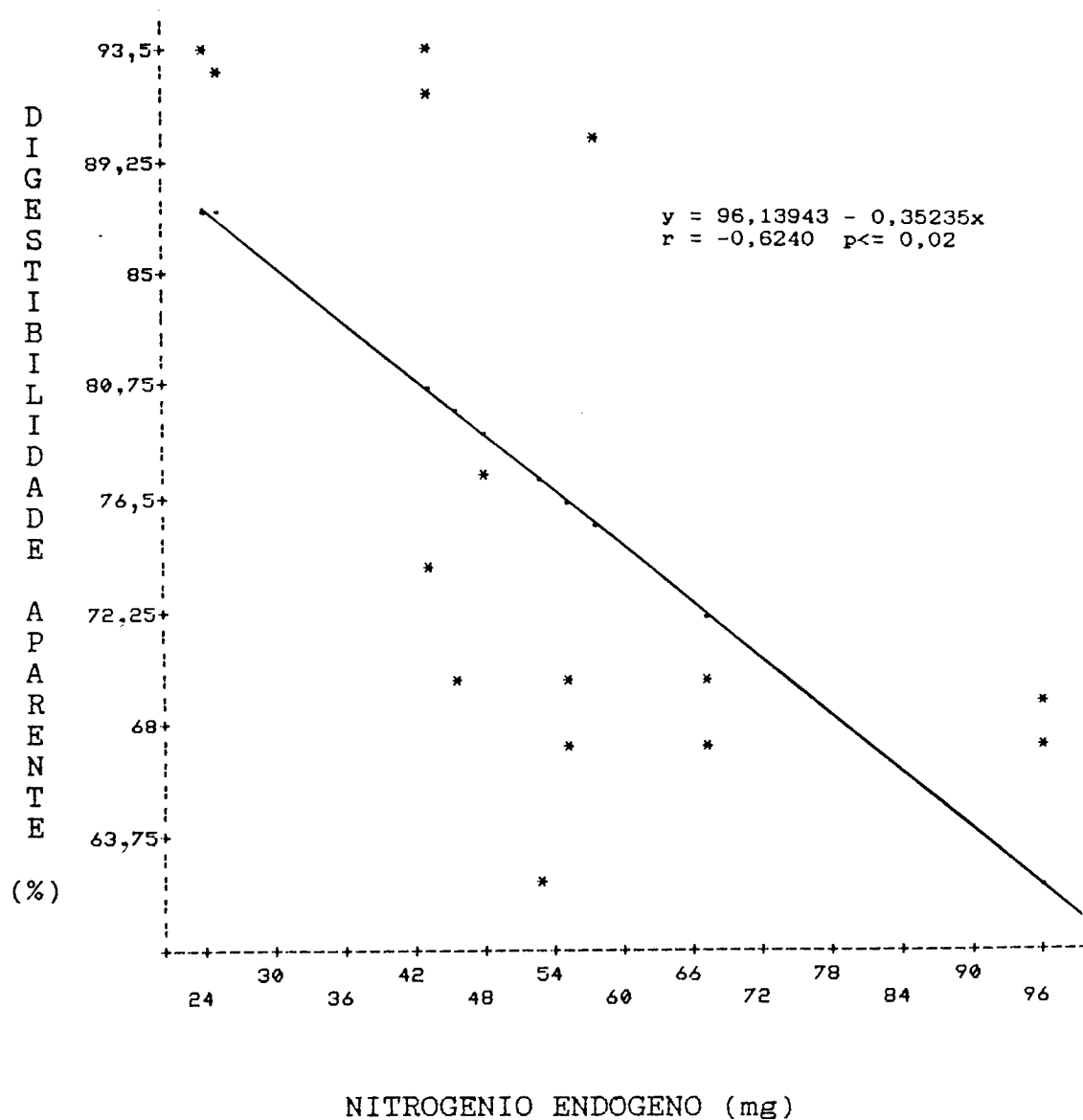


FIGURA 5. Regressão linear para a relação entre digestibilidade aparente (%) e nitrogênio endógeno fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 μCi de ^3H -Arg, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3.

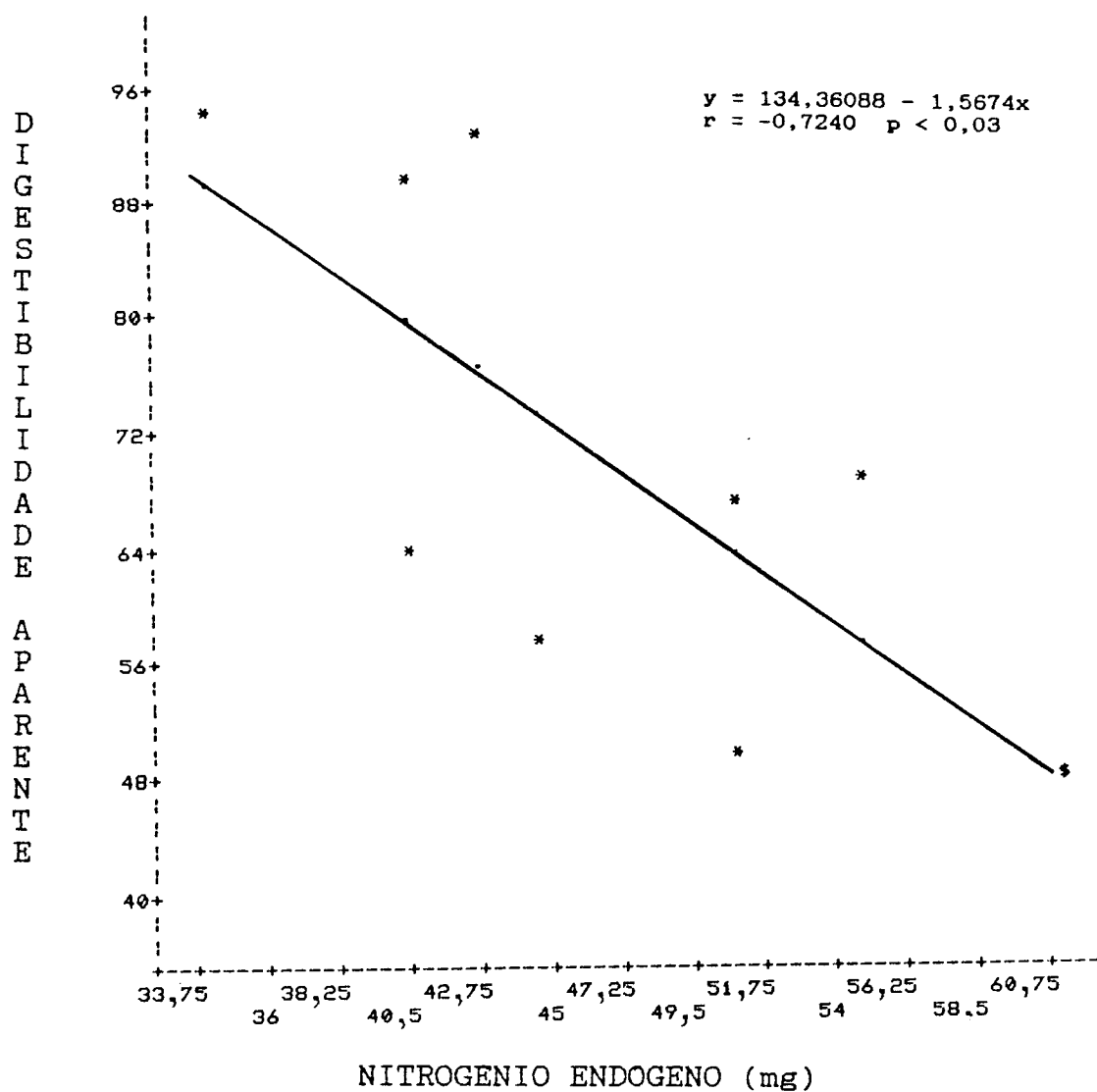


FIGURA 6. Regressão linear para a relação entre digestibilidade aparente (%) e nitrogênio endógeno fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 42 μCi de ^3H -Gly, após balanço de 4 dias em dietas de caseína feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3.

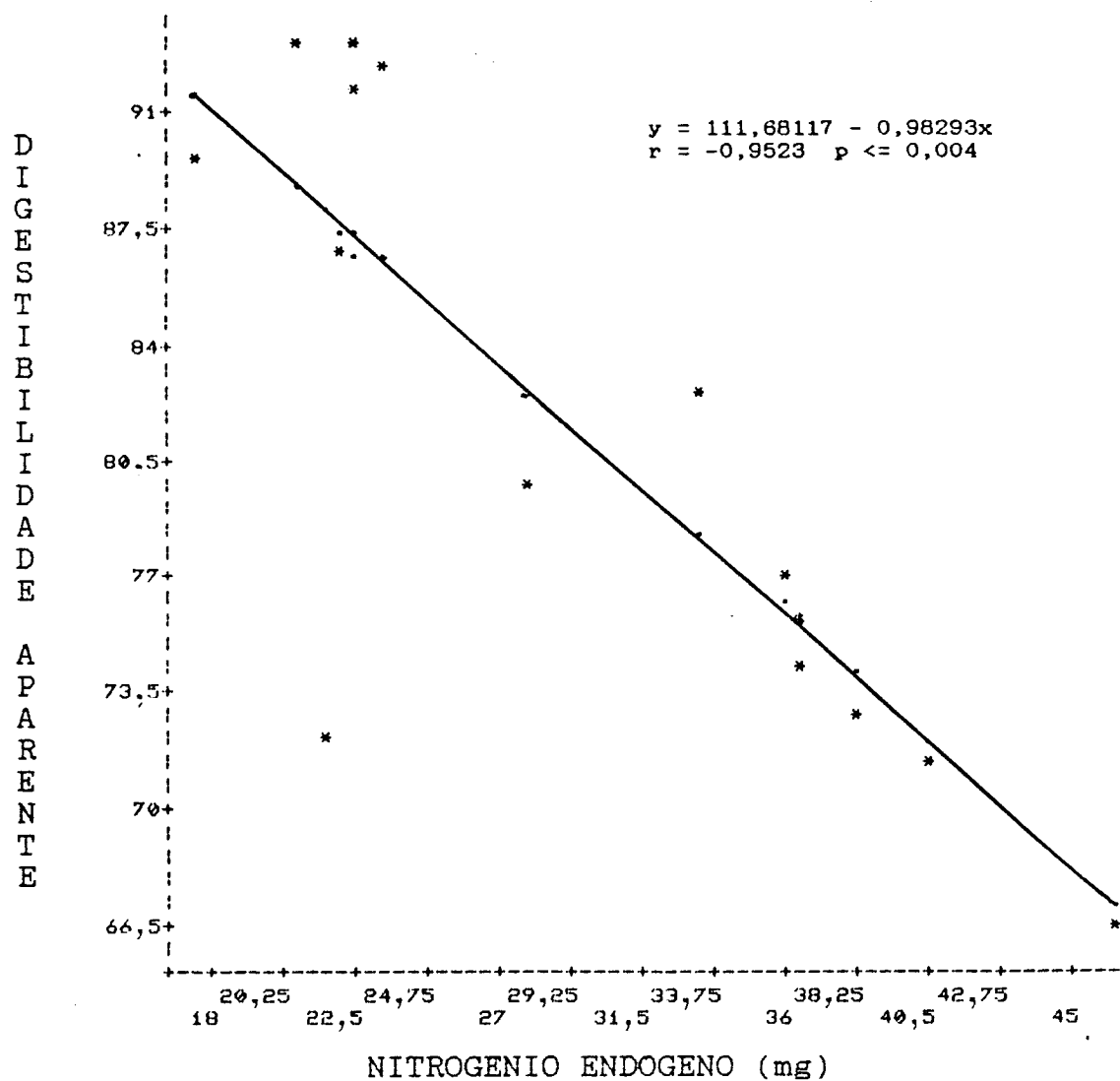


FIGURA 7. Regressão linear para a relação entre digestibilidade aparente (%) e nitrogênio endógeno fecal (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 45 μCi de ^3H -Leu, após balanço de 4 dias em dietas de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e cv. Aeté 3.

digestibilidade trouxe valores relativamente superiores àqueles obtidos por correção através de dieta aprotéica, devido à eliminação da interferência do material endógeno fecal. A correção da digestibilidade de (*Phaseolus vulgaris*) através do uso de isótopos foi referida por Oliveira e Sgarbieri (1986 a, 1986 b), que denominaram digestibilidade "real".

As radioatividades dos intestinos delgados dos ratos sacrificados periodicamente a 6, 24, 48, 72 e 96 horas, após a injeção de ^3H -arginina, para dietas contendo caseína e feijão cv. Carioca 80, após a injeção de ^3H -leucina nos ratos alimentados com dieta de feijão, estão apresentadas na Tabela 17. Esta determinação foi monitorizada com radioautografia, apresentada nas Figuras 8 e 9. Tanto estas Figuras como a Tabela 17 demonstram com clareza a incorporação maior de ^3H -arginina do que ^3H -leucina. Pela Tabela 17 evidencia-se a liberação mais acentuada do isótopo em período de 24 a 48 horas. Com 72 horas, a presença de ^3H -leucina é mínima (Figura 9), só visível com maior aumento e em pontos isolados. Outra observação é que com 24 horas da injeção de ^3H -arginina, a radioatividade na vilosidade e nas criptas de Lieberkühn era de mesma intensidade. No ensaio com ^3H -arginina, onde comparou-se a incorporação do isótopo em tecidos dos ratos em dieta de caseína com os em dieta Carioca 80, observou-se, até certo ponto, uma diferença de incorporação entre as duas dietas (Tabela 17), mas este fato não ficou claro pela radioautografia (Figura 8).



FIGURA 8. Radioautografia do jejuno de ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, após 24 horas de injeção de 50 μ Ci de 3 H-Arg, e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 (a) e caseína (b), como fontes protéicas. Os pontos escuros mostram o local onde a molécula tritiada foi incorporada (grãos de prata reduzida).



FIGURA 9. Radioautografia do jejuno de ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, após 24 horas (a), 48 horas (b) e 72 horas (c) de injeção de 45 μ Ci de ^3H -Leu, e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, como fonte protéica. Os pontos escuros mostram o local onde a molécula tritiada foi incorporada (grãos de prata reduzida).

TABELA 16. Radioatividade, em diferentes tempos, do conteúdo do intestino grosso em ratos¹ Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μ Ci de ^3H -Arg e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e caseína, como fonte protéica.

Radioatividade (μ Ci/g) do conteúdo do intestino grosso		
Horas	Caseína	Carioca 80
6	1,80	1,80
24	0,39	0,39
48	0,28	0,29
72	0,17	0,16
96	0,08	0,12

1 - Os resultados representam um rato por período de tempo de dieta, pesando $62,0 \pm 0,5\text{g}$ após jejum de 16 horas; o período de adaptação foi de 2 dias.

TABELA 17. Radioatividade, em diferentes tempos, do conteúdo do intestino delgado em ratos¹ Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, injetados com 50 μ Ci de ^3H -Arg ou 45 μ Ci de ^3H -Leu e colocados em dietas contendo feijão cv. Carioca 80 e caseína, como fontes protéicas (12,0 + 1,0%).

Radioatividade do intestino delgado (μ Ci/g)			
Horas	Arginina		Leucina
	Caseína	Feijão	Feijão
6	2,29	2,87	0,60
24	1,66	2,06	0,40
48	1,41	1,17	0,06
72	1,31	1,03	0,07
96	1,16	0,96	0,10

1 - Os resultados representam um rato por período de tempo de dieta, pesando $70,3 \pm 2\text{g}$ após jejum de 16 horas, o período de adaptação foi de 2 dias.

4.4 Ensaios com Nucleosídeos

4.4.1 Ensaio com (G-³H)-adenosina

A radioatividade das fezes e urinas dos ratos previamente jejuados, em balanço de nitrogênio, injetados com [G-³H]-adenosina como precursor de ácidos nucleicos, especialmente RNA, utilizando dietas de caseína e Carioca 80 como fontes protéicas, e aprotéica, como também a radioatividade dos intestinos delgados e RNA das fezes, estão apresentados na Tabela 18. Observa-se uma média de radioatividade significativamente maior ($p < 0,05$) nas fezes e no intestino delgado dos ratos em dieta de feijão, em comparação à aprotéica. Em relação à caseína, esta diferença não chega a ser significativa. Para a radioatividade do intestino delgado encontrou-se diferença significativa entre os três grupos. Com referência à radioautografia, a Figura 10, demonstra a presença do nucleosídeo ao nível de vilosidades de jejuno em dieta de caseína, aprotéica e feijão, respectivamente. A Figura 10 esclarece que a ³H-adenosina estava ainda integrando-se ao metabolismo celular após 96 horas de administração. A distribuição da radioatividade pelas células do jejuno dos ratos não confirmou uma diferença nítida nas três dietas.

Em relação ao RNA, encontra-se um valor significativamente maior ($p < 0,05$) para as fezes dos ratos em dieta

de feijão do que os em dieta de caseína e aprotéica. Determinou-se a correlação entre radioatividade e o RNA das fezes. A regressão foi calculada com ajuste linear e o coeficiente de correlação obtido foi $r = 0,8939$ ($p < 0,05$). O modelo ajustado para o ensaio está apresentado junto com o diagrama de dispersão na Figura 11. Assim, pôde-se concluir que a maior incorporação do precursor em RNA das células e o aumento da descamação destas no intestino e sua posterior excreção nas fezes, é, em parte, responsável pelo aumento da radioatividade nas fezes dos ratos em dieta de feijão. Entretanto, esta conclusão precisa ser tomada com cautela, pois o modelo ajustado para regressão mostra que parte da radioatividade chega às fezes sem ser ligado ao RNA. De fato, na Tabela 18 observa-se uma diferença significativa entre RNA, enquanto a diferença de radioatividade entre as três dietas é pequena, não diferindo uma da outra. Neste sentido deve-se levar em consideração que o grupo em dieta de feijão consumiram 250 mg de RNA proveniente do feijão. Todavia, sabe-se que as células descamadas com seus RNAs marcados são jogadas no intestino delgado, onde sofrem a ação das enzimas e são transformadas a mononucleotídeos e, com subsequente hidrólise, a nucleosídeos que podem ser oxidados a ácido úrico e este ser reabsorvido pela mucosa intestinal e excretado na urina (Harper, 1982; Armstrong, 1989). Portanto, os catabólitos do metabolismo dos RNA das células descamadas no conteúdo intestinal, como também os da própria [G-³H]-adenosina, chegam ao intestino grosso onde

TABELA 18. Radioatividade de fezes, urinas e intestino delgado e RNA fecal, em ratos¹ Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas e injetados com 50 μ Ci ³H-Adenosina e colocados nas dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e caseína, como fontes protéicas ($10,8 \pm 0,9\%$) e aprotéica ao fim de balanço de 4 dias.

Dieta	Radioatividade			RNA (ng) das Fezes Total
	Fezes Totais	Urina	Intestino Delgado	
Caseína	0,051 \pm 0,01 (ab)	2,61 \pm 1,31 (a)	0,035 \pm 0,00 (a)	76,2 \pm 23,6 (a)
Carioca 80	0,072 \pm 0,02 (a)	2,35 \pm 4,97 (a)	0,075 \pm 0,06 (b)	150,1 \pm 52,6 (b)
Aprotéica	0,037 \pm 0,01 (b)	0,81 \pm 1,34 (b)	0,057 \pm 0,01 (c)	23,0 \pm 12,6 (a)

(1) - Os resultados representam a média de 3 a 4 ratos, pesando $66,9 \pm 7,8$ g, após jejum de 16 horas e adaptação de 2 dias.

(a,b,c) - Valores na mesma coluna, assinalados com a mesma letra, não diferem ($p < 0,05$)

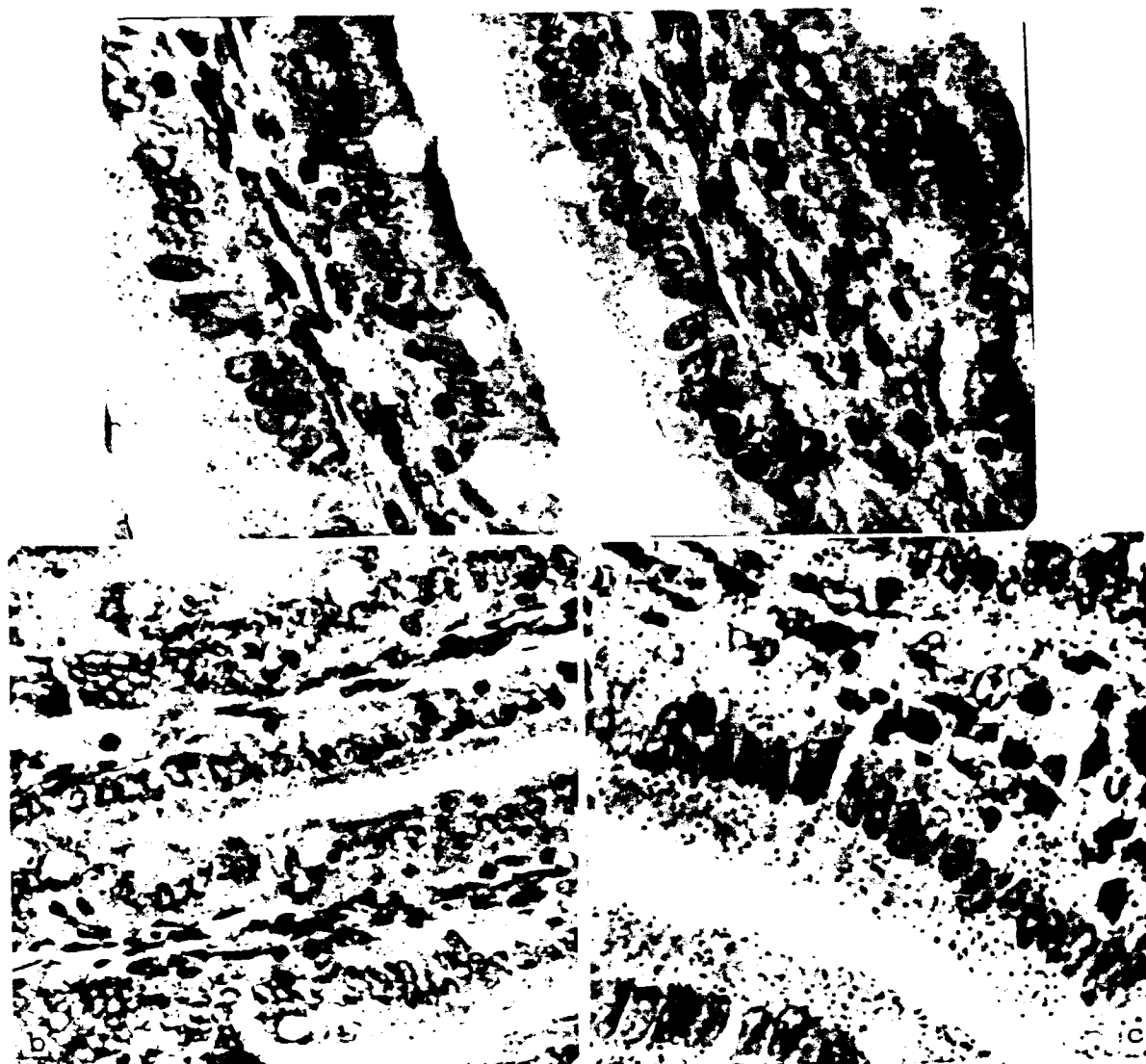


FIGURA 10. Radioautografia de jejuno de ratos Wistar, previamente jejuados e adaptados às dietas, após 96 horas de injeção de 50 μCi de ^3H -adenosina, e colocados em dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 (a), caseína (b), como fonte protéica, e aprotéica (c). Os pontos escuros mostram o local onde a molécula tritiada foi incorporada (grãos de prata reduzida).

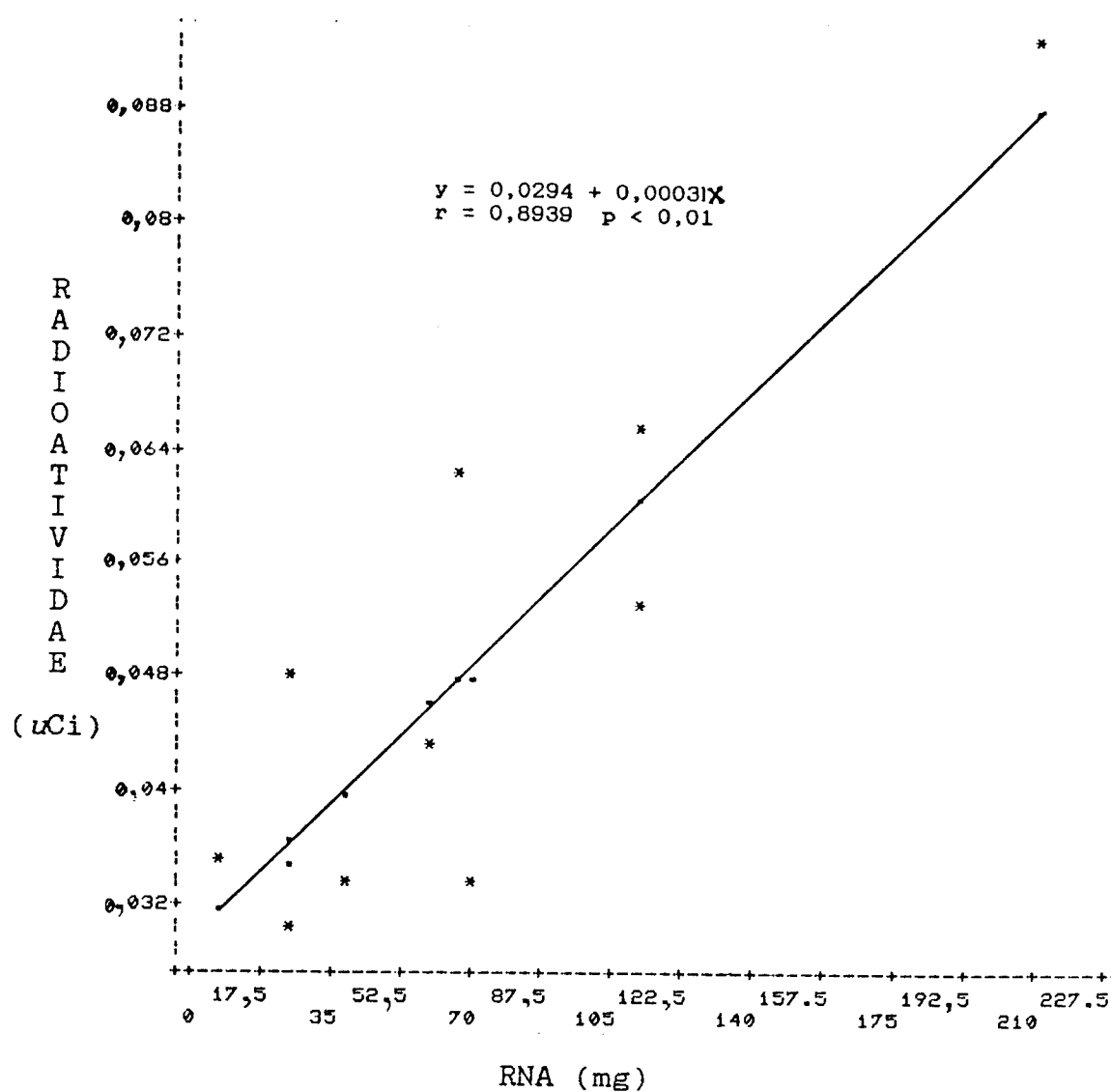


FIGURA 11. Regressão linear para a relação entre radioatividade das fezes (uCi) e RNA (mg) em ratos Wistar, previamente jejuados, adaptados às dietas e injetados com 50 uCi de ^3H -Adenosina, após balanço de 4 dias de caseína, feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80, cv. Aeté 3 e aprotéica.

serão incorporadas pelos microorganismos. Quanto maior a população bacteriana tanto maior será a incorporação dos metabólitos, entre outros, água tritiada. Na determinação da radioatividade das fezes, a água tritiada livre será eliminada durante a secagem mas, a água tritiada que está incorporada ao microorganismo pode ocasionar uma radioatividade mais alta para as fezes. Assim, esta poderá ser uma explicação alternativa para a correlação direta observada entre as radioatividades das fezes e o RNA, que poderá ser de fonte microbiana, ou seja, a maior radioatividade e RNA encontradas nas fezes dos ratos em dieta de feijão, em relação á caseína, pois na literatura existem trabalhos, já referidos, que o feijão aumenta a atividade dos microorganismos no intestino grosso. De qualquer maneira, a diferença significativa de radioatividade mostra que o grupo em dieta de feijão apresenta maior incorporação de ^3H -adenosina do que o grupo de caseína. Esta maior incorporação pode indicar um aumento na proliferação celular do intestino. Porém, como a radioatividade das fezes não diferiu entre os dois grupos e a diferença significativa de RNA pode ter outros motivos além da descamação, a maior retenção de material marcado no tecido do intestino delgado dos ratos em dieta de feijão, pode ser indicativa de hiperplasia ou hipertrofia do intestino, bem como a maior necessidade de outros derivados de adenosina pelo intestino, tais como ATP, NAD, etc. O aumento de peso do intestino delgado de ratos por ação de lectinas de feijão

"Kidney" cru, foi demonstrado por Greer e colaboradores (1985). No presente estudo, utilizando-se feijão cozido, observou-se fenômeno semelhante, embora não conhecendo-se a magnitude do aumento.

4.4.2 Ensaio com [5-³H]-uridina

Os valores da radioatividade do intestino delgado dos ratos em dieta de caseína e Carioca 80, obtidos após um tempo de 15 dias e a injeção de [5-³H]-uridina, como precursor de RNA (Schaer et alii, 1969), está apresentada na Tabela 19. Observa-se maior radioatividade nos tecidos dos intestinos delgados dos ratos alimentados com dieta de feijão do que os alimentados com dieta de caseína, para os três tempos analisados. As respectivas radioautografias destes tecidos evidenciam uma leve incorporação da radioatividade nos tecidos, não tendo sido esclarecedora (Figura 12), pois embora esteja evidente na Tabela 19 que a radioatividade incorporada tenha sido significativamente maior para os ratos em dieta de feijão e ocorrida uma liberação mais acentuada com 6 horas, nas amostras colhidas para radioautografia, a radioatividade encontra-se igualmente distribuída pela célula independente do tempo e da dieta. Pelo resultados da Tabela 19 podemos concluir um metabolismo maior da uridina em intestino delgado dos ratos na dieta de feijão. Metabolicamente, a uridina incorporada é utilizada para síntese de

TABELA 19. Radioatividade do intestino delgado, em ratos¹ Wistar, mantidos durante 15 dias nas dietas e injetados com 120 uCi de ³H-uridina, para dietas contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca 80 e caseína, como fontes protéicas ($11,0 \pm 0,3\%$), às 2 horas, 6 horas e 12 horas.

Dieta	Radioatividade (uCi/g)		
	2 Horas	6 Horas	12 Horas
Caseína	$0,231 \pm 0,065$	$0,056 \pm 0,001$	$0,068 \pm 0,015$
Carioca 80	$0,679 \pm 0,064$	$0,131 \pm 0,024$	$0,104 \pm 0,007$

(1) - Os resultados representam a média de 2 ratos, pesando $120,1 \pm 6,5$ g.

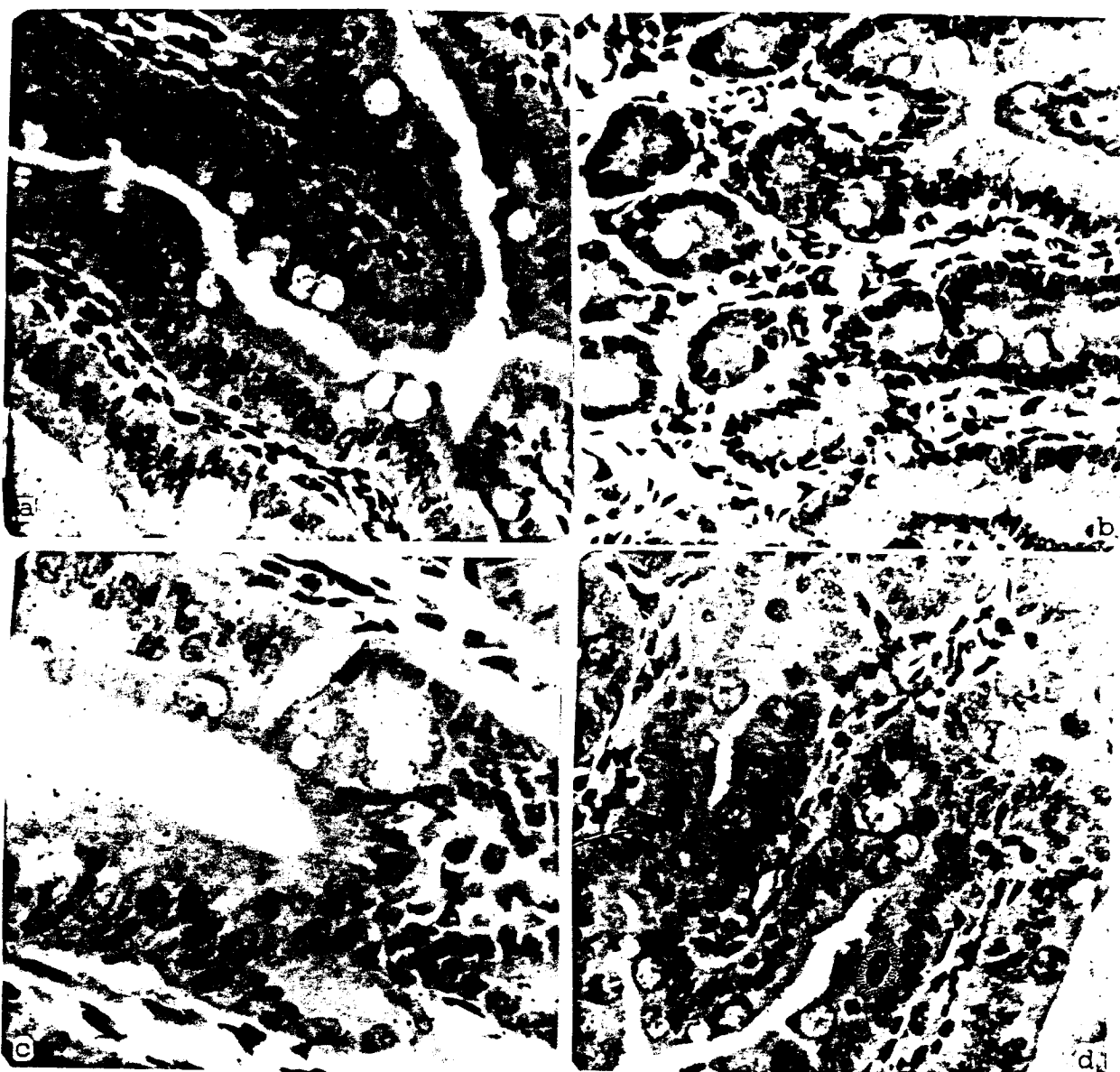


FIGURA 12. Radioautografia de jejuno de ratos Wistar em dieta de caseína após 2 horas (a), 6 horas (b) e 12 horas (d) de injeção de 120 μ Ci de Uridina e em dietas de feijão após 2 horas, os ratos foram previamente jejuados e adaptados às dietas. Os pontos escuros mostram o local onde a molécula tritiada foi incorporada (grãos de prata reduzida).

nucleosídeos, especialmente RNA, e outros derivados tais como coenzimas, compostos fosfatos de alta energia como UTP, que além de ser o precursor para a polimerização dos nucleotídeos de uridina em RNA, é utilizado nas reações que envolvem a conversão da galactose a glicose (Martin, 1982; Armstrong 1989). A liberação acentuada da radiatividade num intervalo relativamente curto de 6 horas, ainda que em parte deva ser atribuída a células descamadas, outra parte pode ser devida a metabólitos do metabolismo da uridina que, entre outros, sabe-se que [5-³H]-uridina, além de incorporar em RNA, tornando-o marcado, é utilizada na síntese do DNA, sendo que para isso o trítio que está na posição 5 será liberado na transformação de uracila a timidina, dando entrada a um grupo metil; assim, o trítio liberado pode ser fonte de radioatividade nas fezes; pode-se portanto inferir que maior liberação pode ser indicativo de maior proliferação celular e/ou maior produção de DNA.

5. CONCLUSOES

Nas condições em que foi desenvolvido o trabalho pôde-se concluir que:

5.1 Tendo-se em vista o maior coeficiente de correlação linear ($r = 0,8694$, $p < 0,001$), assim como o maior parâmetro angular ($B = 0,006174$), obtidos no modelo linear ajustado para a relação entre a radioatividade e o nitrogênio das fezes, ao utilizar-se ^3H -arginina como marcador, pode ser inferido que este aminoácido consistiu em marcador protéico mais apropriado do que a ^3H -leucina e ^3H -glicina ($r = 0,7708$; $B = 0,00258$ e $r = 0,7712$; $B = 0,000824$, respectivamente).

5.2 Os experimentos utilizando-se os aminoácidos arginina e leucina tritiados demonstraram uma maior excreção endógena de nitrogênio fecal nos ratos em dietas de feijão em relação àqueles em dieta aprotéica (133 a 166% maior); dentre os dois cultivares de feijão utilizados, o cv. Carioca 80 ocasionou uma excreção maior de nitrogênio fecal endógeno, também com relação à dieta de caseína ($p < 0,05$).

5.3 Os percentuais de nitrogênio endógeno e exógeno das fezes dos ratos (média de $27,9 \pm 4,9\%$ e $72,1 \pm 4,9\%$, respectivamente), foram semelhantes para as três fontes protéicas, caseína e feijão cv. Carioca 80 e Aeté 3, o que permitiu concluir que o aumento de nitrogênio endógeno das fezes era proporcional ao nitrogênio fecal total excretado.

5.4 A incorporação significativamente ($p < 0,05$) maior de $[G-^3H]$ -adenosina e $[G-^3H]$ -uridina no intestino delgado dos ratos em dieta de feijão, em relação à caseína e aprotéica, foi indicativo de um maior metabolismo dos nucleosídeos; porém, como os resultados obtidos não confirmaram maior descamação do epitélio, este maior metabolismo foi considerado como indicativo de hiperplasia e/ou hipertrofia do tecido intestinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABRAMS, G. D.; BAUER, H.; SPRINZ, H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. *Lab. Invest.*, Baltimore, 12: 355-64, 1963.
2. ACTON, J. C.; BREYER, L.; SATTERLEE, L.D. Effect of dietary fiber constituents on the in vitro digestibility of casein. *J. Food. Sci.*, Chicago, 47: 556-60, 1982.
3. ADELSON, J. W. & ROTHMAN, S. S. Chymodenin, a duodenal peptide: specific stimulation of chymotrypsinogen secretion. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 229: 1680-6, 1975.
4. 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. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 28: 935-8, 1980.
5. ARMSTRONG, F.B. *Biochemistry*, 3. ed. Oxford, Oxford University Press, 1989.p.215-34.
6. ASCHE, G.L.; LEWIS, A.J.; PEO JR., E.R. Protein digestion in weanling pigs: effect of feeding regimen and endogenous protein secretion. *J. Nutr.*, Bethesda, 119: 1083-91, 1989.

7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 12.ed. Horwitz, W. ed., Washington, 1975. p.857.
8. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 13.ed. Horwitz, W. ed., Washington, 1980. p.211.
9. BADAWEY, A. M.; CAMPBELL, R. M.; CUTHERTSON, D. P.; FELL, B.F. Changes in the intestinal mucosa of the sheep following death by human killer. *Nature*, Utrecht, 180: 756-7, 1957.
10. BANERJI, A.P. & SOHONIE, K. Trypsin inhibitor from field beans *Dolichos Cablab*. Isolation, purification, and properties of a trypsin inhibitor from field beans. *Enzimologia*, The Hague, 36: 137-52, 1969.
11. BARKA, T. E. & ANDERSON, P. S. *Histochemistry; Theory, practice and bibliography*. New York, Harper & Row, 1963. 789p.
12. BARROGA, F. C.; LAURENA, C. A.; MENDOZA, E.M. Effect of condensed tannine on the in vitro protein digestibility of munga bean (*Vigna Radiata* L.Wilczek). *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 33: 1157-9, 1985.

13. BELITZ, H. D.; LYNEN, F.; WEDER, K. P. S. Comparative studies on inhibitory action of some legume seeds, potato tubers, and bran against human and bovin proteases. *zleb. unt. forsh.*, Munchen, 174: 442-6, 1982.
14. BENDER, A.E. & MOHAMMADIHA, H. Low digestibility of legume nitrogen. *Proc. Nutr. Soc.*, Cambridge, Great Britain, 40 : 66A, 1981.
15. BENDER, F. E.; DOUGLAS, L. W.; KRAMER, A. *Statistical methods for food and agriculture*. Westport, AVI, 1982. p.91-4.
16. BERGNER, H.; SEIDLER, W.; SIMON, O; SCHMANDKE, H. Digestibility and dietary quality of non acetylated *Vicia faba* proteins in maintenance. *Ann.Nutr.Metab.*, Basel, 28: 156-63, 1984.
17. BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, Ottawa, 37: 911-17, 1959.
18. BLUMEN, G. & MERZEL, J. *Radioautografia: princípios, aplicações e técnicas*. Piracicaba, Faculdade de Odontologia, UNICAMP., 1976. 96 p.

19. BOSSHARDT, D.K. & BARNES, R.H. The determination of metabolic fecal nitrogen and protein digestibility. *J. Nutr.*, Bethesda, 31: 13-21, 1946.
20. BOURDEL, G. Effect of separate feeding of proteins and lipids on pancreatic adaptation in the rat. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 244: G125-G130, 1983.
21. BOYD, G.S. & EASTWOOD, M.A. Studies on the quantitative distribution of bile salts along the rat small intestine under varying dietary regimens. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam., 152: 159-64, 1968.
22. BRADBEAR, N. & BOULTER, D. The use of enzymic hydrolysis in vitro to study the digestibility of some *Phaseolus* seed proteins. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.*, The Hague, 34: 3-7, 1984.
23. BRESSANI, R. Legumes in human diets and how they might be improved. In: MILNER, M. ed. *Nutritional improvement of food legumes by breeding*; Proceedings of the Symposium Sponsored by PAG, FAO, Rome, Jul 1972. New York, Protein Advisory Group United Nations, 1973. p.15-42.

24. BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. The nutrition role of polyphenols in beans. In: HULSE, J. H. ed. Polyphenols in cereals and legumes. Ottawa, IDRC, 1980. 61p.
25. BROWN, R. C.; KELLEHER, J.; LOSOWAKY, M. S. The effect of pectin on the structure and function of the rat small intestine, *Br.J.Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 42: 357-65, 1979.
26. CALLOWAY, D.H.; HICKEY, C.A.; MURPHY, E.L. Reduction of intestinal gas forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. *J. Food Sci.*, Chicago, 36: 251-3, 1971.
27. CHANG, K.C. & SATTERLEE, L.D. Isolation and characterization of the major protein from Great Northern beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, Chicago, 46: 1363-73, 1981.
28. CONRAD, M.E.; WEINTRAUB, L.R.; CROSBY, W.H. The role of the intestine in iron kinetics. *J. Clin. Invest.*, New York, 43: 963-74, 1964.
29. CORNU, A. & DELPEUCH, F. Effect of fiber in sorghum on nitrogen digestibility. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, 34: 2454-9, 1981.

30. CORRING, T. Endogenous proteins excreted in the pancreatic juice of swine. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, Paris, 15: 115-8, 1975.
31. CREAMER, B.; SHORTER, R. G.; BAMFORTH, J. The turnover and shedding of epithelial cells. I. The turnover in the gastrointestinal tract. The shedding in the small intestine. *Gut*, London, 2: 110-6, 1961.
32. CROFT, D.N. & LUBRAN, M. The estimation of desoxyribonucleic acid in the presence of sialic acid: application to analysis of human gastric washings. *Biochem. J.*, London, 95: 612-20, 1965.
33. CROFT, D.N.; LOEHRY, C.A.; TAYLOR, J.F.N.; COLE, J. DNA and cell loss from normal small-intestinal mucosa. *Lancet*, London, 2: 70-3, 1968.
34. DA COSTA, L.R.; CROFT, D.N.; CREAMER, B. Protein loss and cell loss from the small-intestinal mucosa. *Gut*, London, 12: 179-83, 1971.
35. DAGORN, J.C. Non-Parallel enzyme secretion from the rat pancreas :in vitro studies. *J. Physiol.*, London, 280: 435-8, 1978.

36. DAGORN, J. C. & MONGEAU. Different action of hormonal stimulation on the biosynthesis of three pancreatic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, 498: 76-82, 1977.
37. DAGORN, J.C. & LAHAIE, R.G. Dietary regulation of pancreatic protein synthesis. I. Rapid and specific modulation of enzyme synthesis by changes in dietary composition. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, 654: 111-8, 1981.
38. DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. In vitro enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris*, L. *J. Food. Sci.*, Chicago, 52: 1326-9, 1987a.
39. DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. In vitro digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein: the role of heatstable protease inhibitors. *J. Food. Sci.*, Chicago, 52: 1330-4, 1987b.
40. DESHPANDE, S. S. & DAMODARAN, S. Structure-Digestibility relationship of legume 7S proteins. *J. Food Sci.*, Chicago, 54: 1,108-13, 1989.

41. 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.), J.Food Sci., Chicago, 47: 1846-9, 1982.
42. DOMENE S.M.A. Estudo do valor nutricional da proteína de feijão-comum, (*Phaseolus vulgaris*, L.), feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*, L.), ervilha (*Pisum sativum*, L.) e grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L.) utilizando marcação com nitrogênio 15. Campinas, 1990. Tese (Mestrado), Fac. Eng. Alim. Univ. Est. Campinas.
43. DRASAR, S.B. & JENKINS, D.J.A. Bacteria, diet and large bowel cancer. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, 29: 1410-16, 1976.
44. DUBICK, A.M.; MAJUMDAR, A.P.N.; KAYSEN, A.G.; BURBIGE, E.J.; GEOKAS, M. C. Secretagogue - Induced enzyme release from the exocrine pancreas of rats following adaptation to a high protein diet. J. Nutr., Bethesda, 118: 305-10, 1988.
45. DURIGAN, J.F. Estudo da toxidez, composição e valor nutritivo das proteínas de cultivares brasileiros de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) Campinas, 1985 Tese (Doutorado) Fac. Eng. Alim. Agric. Univ. Est. Campinas.

46. EASTWOOD, M.A. & HAMILTON, D. Studies on the adsorption of bile salts of non-absorbed components of diet. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, 152: 165-73, 1968.
47. ECKNAUER, R.; SIRCAR, B.; JOHNSON, L.R. Effect of dietary bulk on small intestinal morphology and cell renewal in the rat. *Gastroenterology*, Philadelphia, 81: 781-6, 1981.
48. EL-HARITH, E.A.; WALKER, R.B.; BIRCH, G.G.; SUKAN, G. Some factors influencing cecal enlargement induced by raw potato starch in the rat. *Food Chem.*, Barking, 2: 279-89, 1977.
49. FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; GEE, J. M.; JOHNSON, I. T. The influence of cooked kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) on intestinal cell turnover and faecal nitrogen excretion in the rat. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 49: 303-12, 1983.
50. FISHER, M.M.; KAKIS, G.; YOUSEF, I.M. Bile acid pool in Wistar rats. *Lipids*. Champaign, 11: 93-6, 1975.
51. FLEMING, S.E. A study of relation between flatus potential and carbohydrate distribution in legume seeds. *J. Food Sci.*, Chicago, 46: 794-8, 1981.

52. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION FOOD, Food Balance Sheets: 1964-1966. FAO. Rome, 1971.
53. GEOKAS, M.C. Ethanol and the pancreas. *Med. Clin. North Am.*, Philadelphia, 68: 57-75, 1984.
54. GERTLER, A. & NITSAN, Z. The effect of trypsin inhibitors on pancreatopeptidase E, trypsin, chymotrypsin and amylase in the pancreas and intestinal tract of chicks receiving raw and heated soya-bean diets. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 24: 893-904, 1970.
55. GILTER, C. Protein digestion and absorption in nonruminants. In: MUNRO, H.N. & ALLISON, J.B. eds. *Mamalian protein metabolism*. New York, Academic Press, 1964. p.35-40.
56. GIRARD-GLOBA, A.G.; BOURDEL, G.; LARDEUX, B. Regulation of protein synthesis and enzyme accumulation in the rat pancreas by amount and timing of dietary protein. *J. Nutr.*, Bethesda, 110: 1380-90, 1980.
57. GREEN, G.M. & LYMAN, R.L. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 140: 6-12, 1972.

58. GREEN, G.M. & NASSET, E.S. Role of dietary protein in rat pancreatic enzyme secretory response to a meal. *J. Nutr.*, Bethesda, 113: 2245-52, 1983.
59. GREEN, G.M.; LEVAN, V.H.; LIDDLE, R.A. Plasma cholecystokin and pancreatic growth during adaptation to dietary protein. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 251: G70-G74, 1986.
60. GREEN, G. M.; OLDS, B. A.; MATHEUWS, G.; LYMAN, R. L. Protein as a regulator of pancreatic enzyme secretion in rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 142: 1162-7, 1973.
61. GREEN, F.; BREWER, A.C.; PUSZTAI, A. Effect of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic function of rats. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 54: 95-103, 1985.
62. GROSSMAN, M.I.; GREENGARD, H.; IVY, A.C. The effect of dietary composition on pancreatic enzymes. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 138: 676-682, 1942.
63. GROSSMAN, M. I.; GREENGARD, H.; IVY, A. C. On the mechanism of adaptation of pancreatic enzymes to dietary composition. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 141: 38-41, 1944.

64. GUSTAFSSON, B.E.; BERGSTROM, S.; LINDSTEDT, S.; NORMAN, A. Turnover and nature of fecal bile acids in germ-free and in infected rats fed cholic acid; bile acids and steroids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 94: 467-71, 1957.
65. HABEEB, A.F.S.A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, New York, 14: 328-36, 1966.
66. HAINES, P.C. & LYMAN, R.L. Relationship of pancreatic enzyme secretion to growth inhibition in rats fed soybean trypsin inhibitor. *J. Nutr.*, Bethesda. 74: 445-52, 1961.
67. HARMUTH-HOENE, A.E. & SCHWERDTFEGER, E. Effect of indigestible polysaccharides on protein digestibility and nitrogen retention in growing rats. *Nutr. Metab.*, Basel, 23: 399-407, 1979.
68. HELLENDORRN, E.W. Intestinal effects following ingestion of beans. *Food Technol.*, Chicago, 23: 795-8, 1969.
69. HILLMAN, L.E.; PETERS, S.G.; FISHER, C.A.; POMARE, E.W. Effects of the fiber componentes pectin, cellulose

- and lignin on bile salt metabolism and biliary lipid composition in man. *Gut*, London, 27: 29-36, 1986.
70. HOLMES, J.H.G.; BAYLEY, H.S.; LEADBEATER, P.A.; HORNEY, F.D. Digestion of protein in small and large intestine of the pig. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 32: 479-89, 1974.
71. HORSZCZARUK, F.; BURACZEWSKA, L.; BURACZEWSKI, S. Amount and composition of intestinal juice collect from isolated intestinal loops of pigs. *Rocz. Nauk Roln. Ser.*, Warszawa, B95: 69-77, 1974.
72. HOWARD, F. & YUDKIN, J. Effect of dietary change upon the amylase and trypsin activities of the rat pancreas. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 17: 281-97, 1963.
73. IDE, T. & HORII, M. Predominant conjugation with glycine of biliary and lumen bile acids in rat fed on pectin. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 61: 545-57, 1989.
74. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análises de alimentos* 2.ed. São Paulo, Inst. Adolfo Lutz, 1976 v.1, c. 4, p.24.

75. JACOBS, F.H. Bidirectional flux of aminoacids across the intestinal mucosa. *Fed. Proc.*, Washington, 24: 946-52, 1965.
76. JACOBS, L.R. & LUPTON, J.R. Effect of dietary fibers on rat large bowel mucosa growth and cell proliferation. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 246: G378-85, 1984.
77. JAFFE, W. G. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 75: 219-20, 1950.
78. JAFFE, W. G. & CAMEJO, G. La acción de una proteína tóxica aislada de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*), sobre la absorción intestinal en ratas. *Acta Cient. Venez.*, Caracas, 12: 59-61, 1961.
79. JEFFERIES, G.H.; HOLMAN, H.R.; SLEISENGER, M.H. Plasma proteins and the gastrointestinal tract. *New Engl. J. Med.*, Waltam, 266: 652-60, 1962.
80. JOHNSON, A.; HURWITZ R.; KRETCHMER, N. Adaptation of rat pancreatic amylase and chymotrypsinogen to changes in diet. *J. Nutr.*, Bethesda, 107: 87-96, 1977.
81. JONES, G.; MOORE, S.; STEIN, W.H. Properties of chroma-

- tographically purified trypsin inhibitors from Lima beans. *Biochemistry*, Washington, 2: 66-71, 1963.
82. KAKADE, M.L.; HOFFA, D.E.; LIENER, I.E. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *J. Nutr.*, Bethesda, 103: 1772-8, 1973.
83. KEIM, V. Rapid adaptation of pancreatic enzyme secretion in the conscious rat. I. Influence of endogenous and exogenous stimulation. *Ann. Nutr. Metab.*, Basel, 30: 104-12, 1986.
84. KEITH, M.G. & BELL, M.J. Digestibility of nitrogen and amino acids in selected protein sources fed to mice. *J. Nutr.*, Bethesda, 118: 561-8, 1988.
85. KHAYAMBASHI, H. & LYMAN, R.L. Growth deprivation and pancreatic and intestinal changes in rats force-fed aminoacid diets containing soybean trypsin inhibitor. *J. Nutr.*, Bethesda, 89: 455-64, 1966.
86. KING, T. P.; PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-induced lesions in rat small intestine 1. Light microscope studies. *J. Comp. Path.*, London, 90: 585-95, 1980.

87. KONISHI, F.; SHIDOJI, Y.; OKU, T.; HOSUYA, N. Effect of non-digestible components of the diet on the growth of intestinal tissues. *Jap. Exp. Med.*, Tokyo, 54: 139-142, 1984.
88. KONTUREK, S. J.; RADEEKI, T.; THOR, P.; DAMBINSKI, A. Release of cholecystokinin by aminoacids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 143: 305-9, 1973.
89. LAHAIE, R. G. & DAGORN, J.C. Dietary regulation of pancreatic protein syntesis. II. Kinetics of adaptation of protein synthesis and its effects on enzyme contents. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, 654: 119-23, 1981.
90. LAJOLO, M. F.; FINARDI, F. F.; MENEZES, W. E. Amylase inhibitors in *Phaseolus vulgaris* beans. *Food Technol.*, Oregon, 45: 119-21, 1991.
91. LANFER MARQUES, U.M. & LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 29: 1068-74, 1981.

92. LANFER MARQUES, U. M. & LAJOLO, F.M. Digestibility of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) albumins and globulin G1: contribution of endogenous nitrogen and sulfur. In: LAJOLO, F.M. & LANFER MARQUEZ, U.M. eds. *Advances in Bean Research. Proceedings. (1986 Seminar). Universidade de São Paulo*, p. 35-43, 1988.
93. LAURENA, A.C.; VAN DEN, T.; MENDOZA, E.M.T. Effects of condensed tannins on the in vitro protein digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 32: 1045-8, 1984.
94. LEBLOND, C.P. & STEVENS, C.E. The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. *Anat. Rec.*, New York, 100: 357-61, 1948.
95. LEBLOND, C.P. & MESSIER, B. Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine - ^3H into mice. *Anat. Rec.*, New York, 132: 247-59, 1958.
96. LEWIS, L.D. & WILLIAMS, J.A. Regulation of cholecystokinin secretion by food hormones, and neural pathways in the rat. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 258: G512-G518, 1990.

97. LIENER, I. E. & THOMPSON, R.M. In vitro and in vivo studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr., The Hague, 30: 13-25, 1980.
98. LOEHRY, C.A.; CROFF, D.N.; SINGH, A.K.; CREAMER, B. Cell turnover in the rat small intestinal mucosa: an appraisal of cell loss. Gut, London, 10: 13-8, 1969.
99. LOW, A. G. Nutrient absorption in pigs. J. Sci. Food Agric., London, 31: 1087-130, 1980.
100. LOW, A. G. Studies on digestion on absorption in the intestines of growing pigs. 5. measurements of the flow of nitrogen; 6. measurements of the flow of amino-acids. Brit. J. Nutr., Cambridge, Great Britain, 47: 137-56, 1979.
101. LYMAN, R.L. & LEPKOVASKY, S. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. J. Nutr., Bethesda, 62: 269-84, 1957.

102. LYMAN, R.L.; WILCOX, S.S.; MONSEN, E.R. Pancreatic enzyme secretion produced in the rat by trypsin inhibitors. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 202: 1077-82, 1962.
103. MAC DONALD, W.C.; TRIER, J.S.; EVERETT, N.B. Proliferation and migration in the stomach, duodenum, and rectum of man. Radioautography studies. *Gastroenterology*, Basel, 46: 405-17, 1964.
104. MAHAFOUZ, C. S.; JOHNSON, J.; LIEPA, G.V. Effect of dietary animal and vegetable protein on gallstone formation and biliary constituents in the hamster. *Lipids*, Champaign, 19: 5-10, 1984.
105. MARTIN, D.W. Jr. Metabolismo dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos. In: HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P. A. eds. *Manual de Química Fisiológica*. 5 ed. São Paulo, Atheneu. 1982. p. 458-78.
106. MARTIN, E.; BERARD, A.; VAGNE, M.; LAMBERT, R. Etudes électrophorétiques de l'action de différents polysaccharides sulfatés sur la protéolyse peptique. *C. R. Séanc. Soc. Biol.*, Paris, 159: 1582-8, 1965.

107. MATSUZAWA, T. & SILSON, R. The intestinal mucosa of germfree mice after whole-body x-irradiation with 3 kiloroentgens. *Radiat. Res.*, New York, 25: 15-24, 1965.
108. MCNURLAN, M. A.; TOMKINS, A. M.; GARLICK, P. J. The effect of starvation on the rates of protein synthesis in rat liver and small intestine. *Biochem. J.*, London, 178: 373-9, 1979.
109. MEYER, J. H. Influency of dietary fiber on metabolic and endogenous nitrogen excretion. *J. Nutr.*, Bethesda, 58: 407-13, 1956.
110. MEYER, J.H. & KELLY, G.A. Canine pancreatic responses to intestinally perfused proteins and protein digests. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 231: 682-91, 1976.
111. MEYER, J. H.; SPINGOLA, L.J.; CROSSMAN, M.I. Endogenous cholecystokinin potentiates exogenous secretion on pancreas of dog. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 221: 742-7, 1971.
112. MITCHELL, H.H. & CARMAN, G.G. The biological value of the nitrogen of mixtures of patent white flour and animal foods. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 68: 183-215, 1926.

113. MONTES, A. L. *Bromatologia*. Buenos Aires, Editorial Universitária, 1966. p.10.
114. MOON, H.W. & JOEL, D.D. Epithelial cell migration in the small intestine of sheep and calves. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, **36**: 187-9, 1975.
115. MOUGHAN, P. J. & RUTHERFORD, S.M. Endogenous flow of total lysin and other aminoacids at the distal ileum of the protein or peptide fed rat: the chemical labelling of gelatin protein of transformation of lysine to homoarginine. *J. Sci. Food Agric.*, London, **52**: 179-92, 1990.
116. MUNRO, N. The determination of nucleic acids. *Method Bioch. Anal.*, New York, **14**: 113-75, 1961.
117. NASSET, E.S. Role of the digestive tract in the utilization of protein and amino acids. *J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, **164**: 172-7, 1957.
118. NASSET, E.S. The role of the digestive tract in protein metabolism. *Am. J. Digest. Dis.*, New York, **9**: 175-90, 1964.

119. NASSET, E. S. Role of the digestive system in protein metabolism. *Fed. Proc.*, Washington, 24: 953-8, 1965.
120. NASSET, E.S. & JU, J.S. Mixture of endogenous and exogenous protein in the alimentary tract. *J. Nutr.*, Bethesda, 74: 461-5, 1961.
121. NASSET, E. S.; JU, J.S.; MC CONNELL, K.P. Comparative digestibility of casein and pancreatic juice proteins in the rat. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, 17: 643-6, 1973.
122. NOGUEIRA, N. L. Determinação do sítio intracelular de síntese do RNA do vírus do anel do pimentão através de auto-radiografia à nível de microscopia eletrônica. Piracicaba, 1978. Tese (Doutorado) Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz" Univ. São Paulo.
123. NORMAN, A. Faecal excretion productions of cholic acid in man. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 18: 173-86, 1964.
124. NORMAN, A. & SJOVALL, J. On the transformation and enterohepatic circulation of cholic acid in the rat. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 233: 872-85, 1958.

125. NOMANI, Z.A.; FASHANDI, E.F.; DAVIS, G.K.; BRADAC, C.J.
Influence of dietary fiber on the growth and protein metabolism of the rat. *J. Food Sci.*, Chicago, **44**: 745-7, 1979.
126. NOMANI, Z. A.; FERGUSSON, S. A. & WATNE, A. L. Type of dietary fibre and fecal steroid excretion. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, **34**: 323-30, 1990.
127. NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION. *ICN diet catalog*: 1977-1978, Cleveland, INC Life Sciences Group, 1978. 18p.
128. OCHOA-SOLANO, A. & GILTER, C. Digestion and absorption of ingested and secreted proteins labeled with ^{75}Se -selenomethionine and ^{35}S -selenomethionine in the gastrointestinal tract of the rat. *J. Nutr.*, Bethesda, **94**: 249-55, 1967.
129. O'DELL, B.L. & BOLAND, A. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, **24**: 804-8, 1976.

130. OLIVEIRA, A.C. Efeito dos peróxidos de lipídeos na digestibilidade *in vitro* de farinha de pescado. Campinas, 1977. Tese (Mestrado), Fac. Eng. Alim. Agric. Univ. Est. Campinas.
131. OLIVEIRA, A.C. Fatores endógenos e exógenos com influência na digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) Campinas, 1986. Tese (Doutorado) Fac. Eng. Alim. Agric. Univ. Est. Campinas.
132. OLIVEIRA, A. C. & SGARBIERI, V.C. Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. *J. Nutr. Bethesda*, 116: 2387-92, 1986^a.
133. OLIVEIRA, A. C. & SGARBIERI, V.C. The Influence of rat endogenous nitrogen excretion on the assessment of bean protein quality. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, Tokyo, 35: 425-36, 1986^b.
134. OLIVEIRA, A. C.; VIDAL, B.C.; SGARBIERI, V.C. Lesions of intestinal epithelium by ingestion of bean lectins in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, Tokyo, 35: 315-22, 1989.

135. PALADE, G. E. Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science*, Washington, 189: 347-58 1975.
136. PAULL, A. A. & SOUTHGATE, D.A.T. McCance and Widdowson's the composition of foods. London, Elsevier Holand Biomedical Press, 1978. 418p.
137. PEARSON, D. Técnicas de laboratório para el analisis de alimentos. Laboratory techniques in food analysis. Zaragoza, Acribia, 1976. p10-2.
- 138 PELLET, P.L. & YOUNG, V.R. Nutricional evolution of protein foods. Tokyo, The United Nations Univesty, 1980. p.62.
139. PINK, I. J.; CROFT, D.N.; CREAMER, B. Cell loss from small intestinal mucosa: a morphological study. *Gut*, London, 11: 217-22, 1970.
140. PION, R.; MENOLES-PEREIRA, E.; PRUGNARD, J. Effect of composition and processing on the nutritive value of some leguminous seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, 59: 105-53, 1979.

141. POORT, S. R. & POORT, C. Effect of diet composition on the protein synthesis pattern of the rat pancreas after a feeding period of five days. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, 606: 138-47, 1980.
142. PROTEIN, digestion and absorption measured by re-entrant canula in the pig. *Nutr. Rev.*, Washington, 37: 149-50, 1979.
143. PUSZTAI, A. General properties of a protease inhibitor from the seeds of kidney beans. *Eur. J. Biochem.*, New York, 5: 252-9, 1968.
144. PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W.; KING, T.P. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc. Nutr. Soc.*, Cambridge, 38: 115-120, 1979.
145. PUSZTAI, A.; CLARKE, E.M.W.; GRANT, G.; KING, T.P. The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins Nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Food Agric.*, London, 32: 1037-46, 1981.
146. QUASTLER, H. & SHERMAN, F.G. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.*, New York, 17: 420-38, 1959.

147. RANKEN, R.; WILSON, R.; BEALMEAR, P. Increased turnover of intestinal mucosal cells of germfree mice induced by cholic acid. *Prot. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 138: 270-2, 1971.
148. REBOUND, J.P.; MARCHIS-MOUREN, G.; COZZONE, A.; DESNUELLES, P. Variations in the biosynthesis rate of pancreatic amylase and chymotrypsinogen in response to a starch-rich and a protein-rich diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, San Diego, 22: 94-9, 1966.
149. RODRIGUEZ, J. V.; DUBIN, M.; CARRILLO, M.C.; RODRIGUEZ-GARAY, E. A. Effects of a protein free diet on biliary lipids and protein secretion in rat. *Nutr. Rep. Int.*, Los altos, 27: 1261-6, 1983.
150. ROGER, Q.R. & HARPER, A.E. Protein digestion nutritional and metabolic considerations. *World Rev. Nutr. Diet.*, Basel, 6: 250-91, 1966.
151. ROMERO, J. & RYAN, D. S. Susceptibility of the major storage protein of the bean, (*Phaseolus vulgaris* L.) to in vitro enzymatic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 26: 784-8, 1978.

152. ROSALESARZU, A. M. Estudio sobre la calidad proteica del frijol y la de tres fracciones derivadas por salubridad diferencial en niños pré-escolares. INCAP, 1972. Tese (Doutorado), Escuela de Nutrición.
153. ROTHMAN, S. S. Independent secretion of different digestive enzymes by the pancreas. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 231: 1847-51, 1976.
154. ROTHMAN, S.S. & WILLEING, H. Different rates of digestive enzyme transport in the presence of cholecystokinin-pancreozymin. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 253: 3543-9, 1978.
155. SATHE, S.K.; IYER, V.; SALUNKHE, D.K. Functional properties of the Great Northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, amino acid composition, in vitro digestibility and application to cookies. *J. Food. Sci.*, Chicago, 47: 435-42, 1981.
156. SAKATA, T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 58: 95-103, 1987.

157. SCHAER, J.C.; GRIEDER, A.; HEINIGER, H.J.; SCHINDLER, R.
Comparison of ^3H -Cytidine and ^3H -5-Uridine as precursor of RNA. *Exp. Cell Res.*, Bern, 56: 449-52, 1969.
158. SCHNEEMAN, B.O. Effect of plant fibre on lipase, trypsin and chymotrypsin activity. *J. Food Sci.*, Chicago, 43: 634-6, 1978.
159. SCHNEEMAN, B.O. & LYMAN, R.L. Factors involved in the intestinal feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 148: 897-903, 1975.
160. SCHNEEMAN, B.O. & GALLAHER, D. Changes in small intestinal digestive enzyme activity and bile acids with dietary cellulose in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, 110: 584-90, 1980.
161. 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. *J. Nutr.*, Bethesda, 107: 281-88, 1977.

162. SCHNEIDER, B. H. The relationship of the metabolic nitrogen of the faeces to body weight and to food intake of rats. *Biochem. J.*, London, **28**: 360-4, 1934.
163. SEGEL, H. I. Isotopes in biochemistry In: *Biochemical calculation*, John Wiley & Sons, 1968. c.5, p. 404-8.
164. SGARBIERI, V.C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família leguminosa. *Ci. e Cult.*, São Paulo, **32**: 78-84, 1980.
165. 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. *J. Food Biochem.*, Westport, **5**: 215-31, 1981.
166. SGARBIERI, V. C.; CLARK, E.M.W.; PUSZTAI, A. Proteolytic breakdown of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) storage proteins :nutritional implications. *J. Sci. Food Agric.*, London, **33**: 881-91, 1982.
167. SHAHKHALIPI, Y.; FINOT, P. A.; HURRELL, R.; FERN, E. Effects of food rich in polyphenols on nitrogen excretion in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, **120**: 346- 52, 1990.

168. SHEARD, N. F. & SCHNEEMAN, B.O. Wheat bran's effects on digestive enzyme activity and bile acid levels in rats. *J. Food. Sci.*, Chicago, 45: 1645-8, 1980.
169. SHENKIN, A. & WRETLIND, A. Parenteral nutrition. *World. Rev. Nutr. Diet.*, Basel, 28: 1-111, 1978.
170. SHURPALEKAR, K. S.; SUNDARAVALLI, O. G.; RAO, M.N. In vitro and in vivo digestibility of legume carbohydrates. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, 19: 111-7, 1979.
171. SKILTON, G. A.; MOUGHAN, P.J.; SMITH, W.C. Determination of endogenous aminoacids flow at the terminal ileum of rats. *J. Sci. Food Agric.*, London, 44; 227-35, 1988.
172. SNOOK, J. T. Dietary regulation of pancreatic enzyme synthesis, secretion and inactivation in the rat. *J. Nutr.*, Bethesda, 87: 297-305, 1965.
173. SNOOK, J. T. & MEYER, J. H. Response of digestive enzymes to dietary protein. *J. Nutr.*, Bethesda, 82: 409-14, 1964.

174. SOUTHGATE, D.A.T. & DURNIN, J.V.G.A. Calorie conversion factors. An experimental reassessment of factors used in the calculation of the energy value of human diets. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 24: 517-35, 1970.
175. SOUTHON, S.; LIVESEY, G.; GEE, J. M.; JOHNSON, I. T. Differences in intestinal protein synthesis and cellular proliferation in well-nourished rats consuming conventional laboratory diets. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 53: 87-95, 1985.
176. STEER, M. L. & GLAZER, G. Parallel secretion of digestive enzymes by the in-vitro rabbit pancreas. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 231: 1860-6, 1976.
177. STEER, M.L. & MANABE, T. Cholecystokinin, pancreozymin induces a parallel discharge of digestive enzymes from the in vitro rabbit pancreas. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 254: 7228-9, 1979.
178. STOCKMANN, F. & SOLING H.D. Regulation of biosynthesis of trypsinogen and chymotrypsinogen by nutritional and hormonal factors in the rat. *Eur. J. Clin. Invest.*, Oxford, 11: 121-32, 1981.

179. TASMAN-JONES, C.; OWEN, R.L.; JONE, A.L. Semipurified dietary fiber and small-bowed morphology in rats. *Dig. Dis. Sci.*, New York, 27: 519-24, 1982.
180. TEZOTO, S.S. & SGARBIERI, V.C. Protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food. Chem.*, Washington, 38: 1152-6, 1990.
181. TOBIN, G. & CARPENTER, K.J. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): A literature review. *Nutr. Abst. Rev. Serie A. Human Exp.* Farnham Royal, 48: 919-36, 1978.
182. TSENG, H.C.; GRENDALL, J H.; ROTHMAN, S.S. Food, duodenal extracts and enzyme secretion by the pancreas. *Am.J.Physiol.*, Bethesda, 243: G304-G312, 1982.
183. TWOMBLY, J. & MEYER, J.H. Endogenous nitrogen secretion into the digestive tract. *J.Nutr.*, Bethesda, 74: 453-60, 1961.
184. VAINTRAUB, I.A.; BRASSUNER, R.; SHUTOV, A.D. The action of trypsin and chymotrypsin on the reserve proteins of some leguminous seeds. *Die Nahrung*, Berlin, 20: 763-71, 1976.

185. VAINTRAUB, I. A.; SELIGER, P.; SHUTOV, A.D. The action of pepsin on the reserve proteins of some leguminous seeds. *Die Nahrung*, Berlin, 23: 15-21, 1979.
186. VILLALON, L.; TUCHWEBER, B.; YOUSEF, I.M. Effects of a low protein diet on bile flow and composition in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, 117: 678-83, 1987.
187. WALKER, A. R.P. Effect of high crude fiber on transit time and the absorption of nutrients in South African Negro School Children. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, 28: 1161-9, 1975.
188. WANG, C. C. & GROSSMAN, M.I. Physiological determination of release of secretion and pancreozymin from the intestine of dogs with transplanted pancreas. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 164: 527-45, 1951.
189. WATERMAN, H.C. & JOHNS, C.O. Studies on the digestibility of proteins in vitro. I. The effect of cooking on the digestibility of phaseolin. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 46: 9-17, 1921.
190. WHITAKER, J.R. & SGARBIERI, V.C. Purification and composition of the trypsin-chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha G2. *J. Food Biochem.*, Westport, 5: 197-213, 1981.

191. WILLIAMS, P.C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *J. Sci. Food. Agric.*, London, 24: 343-8, 1973.
192. WILSON, A.B.; KING, T.P.; CLARKE, E.M.N.; PUSZTAI, A. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) Pectin induced lesions in rat intestine. *Z. Microbiological Studies. J. Comp. Pathol.*, London, 90: 597-602, 1990.
193. WOLZAK, A.; BRESSANI, R.; BRENES, R.G. A comparison of in vivo and in vitro estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.*, The Hague, 31: 31-43, 1981.
194. WYATT, G.M.; HORN, N.; GEE, J.M.; JOHNSON, I.T. Intestinal microflora and gastrointestinal adaptation in the rat in response to non-digestible polysaccharides. *Brit. J. Nutr.*, Cambridge, Great Britain, 60: 197-207, 1988.
195. YOUNOSJAI, M. K.; ADEDOYIN, M.; RANSHAW, J. Dietary components and gastrointestinal growth in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, 108: 341-50, 1978.

196. ZEBROWSKA, T.; SIMON, O.; MUNCHMEYER, R.; BERGNER, H.
Untersuchungen zur sezernierung endogener aminosauern in den verdauungstrakt und zur aminosauernresorption beim schwein. Studies on the aminoacids into the gastrointestinal tract of pigs. Arch. Tierernaehr., Berlin, 26: 69-82, 1976.

Nota: as referências bibliográficas, bem como suas citações no texto deste trabalho, estão dispostas de acordo com as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NB-66/1978).