

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Faculdade de Engenharia de Alimentos
Curso em Ciência da Nutrição**

**DISTRIBUIÇÃO DA MARCAÇÃO COM NITROGÊNIO 15 DE FRAÇÕES
PROTÉICAS DE FEIJÃO-COMUM (*PHASEOLUS VULGARIS*, L.) E DILUIÇÃO
ISOTÓPICA NO PROCESSO DE DIGESTIBILIDADE *IN VITRO***

Autor: Saula Goulart Chaud RA 945223
Nutricionista

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 Mestre em Ciência da Nutrição.

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

Ch393d Chaud, Saula Goulart
Distribuição da marcação com nitrogênio 15 de frações proteicas de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e diluição isotópica no processo de digestibilidade *in vitro* / Saula Goulart Chaud -- Campinas, SP: [s.n] , 1998.

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

1. Nitrogênio 2. Feijão 3. Análise por diluição isotópica.
4. Proteínas. 5. Metionina. I. Oliveira, Admar Costa de
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
(Orientador)

Prof. Dr. Jaime A. Farfan
(Membro)

Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin
(Membro)

Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri
(Membro)

Campinas, de novembro de 1988

Aos que confiaram em mim

DEDICO

A minha mãe pelo apoio, coragem,
compreensão e carinho, que me fizeram
prosseguir nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Aos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho, externo os meus mais sinceros agradecimentos e de modo especial:

ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação segura, compreensão e amizade durante todo o desenvolvimento desta tese.

à Faculdade de Engenharia de Alimentos (DEPAN), UNICAMP, pela oportunidade;

ao Prof. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da USP, pela supervisão dos experimentos com isótopos e determinação de nitrogênio 15.

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

a Deus pela presença constante em minha vida.

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Material	22
4.1.1 Fontes Protéicas	22
4.2 Métodos	22
4.2.1 Determinações Químicas.....	22
4.2.2 Obtenção das proteínas isoladas do feijão	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Caracterização da amostra	27
5.2 Fracionamento protéico da farinha crua, cultivar Piratã 1	27
5.2.1 Teores protéicos do extrato protéico total, das frações isoladas albumina e globulina e do resíduo da extração	27
5.3 Caracterização bioquímica da proteína da farinha crua e das frações isoladas.....	32
5.3.1 Digestibilidade <i>in vitro</i> da proteína da farinha integral crua e do extrato protéico total	32
5.3.2 Metionina potencialmente disponível na proteína da farinha integral de feijão-comum cru, cultivar Piratã 1, no extrato protéico total e nas frações protéicas isoladas albumina e globulina	33
5.4 Resultados obtidos das marcações isotópicas com ¹⁵ N.....	35
6 CONCLUSÕES	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fracionamento protéico a partir da farinha crua de feijão-comum, cultivar Piratã 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	26
FIGURA 2. Balanço de massa e proteínas extraídas da farinha crua, cultivar Piratã 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i>) com NaCl 0,5M, para obtenção do extrato protéico total e resíduo.	30
FIGURA 3. Balanço de massa e proteínas extraídas da farinha crua de feijão-comum, cultivar Piratã 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i>), com 0,5 M NaCl, para obtenção das frações albumina e globulina isoladas e resíduo.....	31

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Teor protéico expresso em g/100g das frações isoladas albumina e globulina, extrato protéico total e do resíduo da extração por NaCl 0,5 M, da farinha de feijão cru, cultivar Piratã 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	29
TABELA 2. Metionina potencialmente disponível na farinha integral de feijão-comum cru, cultivar Piratã 1, no extrato protéico total e nas frações protéicas isoladas albumina e globulina, expressa em g Met/100 g proteína.....	34
TABELA 3. Marcações isotópicas com ¹⁵ N referentes à farinha integral crua de feijão-comum, cultivar Piratã 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i>), suas respectivas frações e digeridos obtidos na digestibilidade <i>in vitro</i> pela pepsina e pancreatina.....	37

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo verificar se a marcação com nitrogênio 15 (^{15}N) de feijão integral, liofilizado, marcado isotopicamente com 1,385 átomos%, é a mesma na proteína e frações protéicas extraídas do feijão, assim como verificar a diluição isotópica do ^{15}N ocorrida na digestibilidade *in vitro*, pela autodigestão das enzimas utilizadas. As proteínas foram extraídas com NaCl 0,5M em pH 7,0. Na avaliação da digestibilidade *in vitro*, utilizou-se o método da hidrólise pela pepsina mais pancreatina.

As marcações isotópicas na farinha integral de feijão, o extrato protéico total, a fração globulina e a fração albumina foram, respectivamente: $1,394 \pm 0,011$; $1,403 \pm 0,012$; $1,399 \pm 0,007$ e $1,399 \pm 0,028$ átomos% de ^{15}N , não sendo encontrada diferença estatística entre as mesmas ($P > 0,05$). Entretanto, foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as marcações acima citadas e a marcação isotópica encontrada para o resíduo da extração, que foi de $0,969 \pm 0,084$ e o nitrogênio originalmente solúvel, que apresentou um valor de $0,923 \pm 0,007$ átomos% ^{15}N .

O digerido da farinha integral apresentou um valor de $1,026 \pm 0,014$ átomos% de ^{15}N , o que indica que efetivamente ocorreu autodigestão relativamente alta das enzimas utilizadas para a obtenção da digestibilidade *in vitro*, uma vez que não estão marcadas e, conseqüentemente, foram em parte responsáveis pela diluição isotópica encontrada. A diluição isotópica encontrada nas substâncias nitrogenadas existentes no digerido do branco da farinha integral, indicou que tais substâncias são marcadas em menor magnitude do que o próprio grão e suas proteínas, o que também influenciou no resultado do digerido da farinha integral. O

digerido do extrato protéico total apresentou um valor de $1,067 \pm 0,009$. Os valores estão indicando a existência de diluição isotópica dos digeridos da farinha integral e do extrato protéico total, em relação à marcação isotópica da farinha e frações protéicas originais, aparentemente devido à autodigestão das enzimas e, em parte, ao nitrogênio originalmente solúvel da amostra, conforme descrito.

A fim de monitorar os processos de extração e fracionamento das proteínas, foi determinada a metionina disponível *in vitro*, utilizando-se a reação do nitroprussiato de sódio. Os valores encontrados foram: farinha integral $0,30 \pm 0,04$; extrato protéico $0,41 \pm 0,01$; albumina $0,37 \pm 0,01$ e globulina $0,41 \pm 0,05$ g/100g proteína, que estão de acordo com resultados usualmente encontrados na literatura.

Como conclusão geral, pôde ser inferido que os índices de qualidade protéica, como a digestibilidade e o valor biológico por balanço de nitrogênio e diluição isotópica, não serão afetados no caso de proteínas extraídas do feijão com NaCl 0,5M, uma vez que a marcação isotópica (^{15}N) da farinha integral e frações protéicas não diferiram ($p > 0,05$). No caso de se trabalhar com farinhas integrais, estes índices poderão apresentar resultados irreais, uma vez que as marcações isotópicas tanto do nitrogênio do resíduo de extração como do nitrogênio originalmente solúvel foram menores.

ABSTRACT

The aim of the present work was to verify if the isotope labelling with nitrogen 15 (^{15}N) obtained in whole lyophilized beans, which had been labelled isotopically with 1.385% of ^{15}N atoms of the total, was the same in the protein and protein fractions extracted from the beans. The aim was also to verify isotopic dilution of ^{15}N , which occurs during *in vitro* digestibility through selfdigestion of the enzymes used. Proteins were extracted using 0.5M NaCl at pH 7.0. In order to assess digestibility *in vitro* the hydrolysis method was applied using pepsin plus pancreatine.

The isotope labelling of the whole bean flour, the total protein extract, the globulin fraction and the albumin fraction were, respectively: 1.394 ± 0.011 ; 1.403 ± 0.012 ; 1.399 ± 0.007 and $1.399\pm0.028\%$ of ^{15}N atoms. No statistical difference was found between these data ($P>0.05$). Nevertheless, significant differences ($P<0.05$) were found between the isotopic labelling mentioned above and those found for the extraction residue which was 0.969 ± 0.084 and the original soluble nitrogen which showed a value of $0.923\pm0.007\%$ ^{15}N atoms.

The *in vitro* digested part of the whole flour showed a value of 1.026 ± 0.014 atoms of ^{15}N , which indicates a relatively high selfdigestion by the enzymes used in the *in vitro* digestibility, since they had not been labeled and consequently were in part responsible for the isotopic dilution found. The isotopic dilution found in the nitrogen substances of the blank of the digested whole flour showed that such substances were less marked than the grain and its proteins which also had an influence on the digested fraction of the whole flour. The digested fraction of the

total protein extract showed a result of 1.067 ± 0.009 . The values pointed out to the occurrence of isotopic dilution of the digested fractions of the whole flour and the total protein extract, in relation to the isotope label of the original flour and protein fractions, which is apparently due to selfdigestion by the enzymes used and to the original soluble nitrogen as a flour, as already described.

In order to control the extraction and fragmentation processes of proteins, the *in vitro* methionine available was determined, using the reaction of sodium nitroprusside. The values found were: whole flour 0.30 ± 0.04 ; protein extract 0.41 ± 0.01 ; albumin fraction 0.37 ± 0.01 and globulin fraction 0.41 ± 0.05 g/100g protein, which correspond to results usually found in the literature.

Concluding, it can be inferred that the protein quality indexes, such as digestibility and biological value using nitrogen balance and isotopic dilution, will not be affected in the case of bean proteins extracted by 0.5M NaCl, since isotopic labelling (^{15}N) of the whole flour and protein fractions did not differ ($p > 0.05$). However, in the case of whole flours, these indexes might produce false results, since the isotope labelling of both residual nitrogen extraction and the original soluble nitrogen were lower than those referred above.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Phaseolus*, da família Leguminosae, inclui espécies conhecidas como feijão, sendo originário da Ásia Tropical e da América Latina, mais particularmente dos planaltos do México e da Guatemala, do Peru, montanhas do norte ocidental da Argentina e do pantanal do Mato Grosso, no Brasil. Durante muito tempo acreditou-se que o feijão era originário da Índia, devido a sua introdução na Europa que ocorreu após as grandes descobertas marítimas do século XV e XVI. Entretanto, determinações de carbono radioativo em vagens e sementes encontradas por arqueólogos em túmulos astecas e incáicos mostraram que o cultivo de feijão deve ter sido domesticado a aproximadamente 7.000 anos atrás na América Central, seu centro de origem, ao qual são incluídas as regiões do Sul dos E.U.A., México e Norte da América do Sul (KAPLAN, 1965). Ele foi introduzido na Europa no século XVI e desde então tornou-se uma cultura muito importante para diversas regiões do mundo. No Brasil, o feijão é a base protéica da alimentação popular.

O conteúdo protéico das espécies e cultivares de *Phaseolus* varia de 18 a 35%. Dada a alta ingestão diária deste grão, imposta por problemas econômicos e culturais, fica claro que o feijão torna-se responsável pelo suprimento de parte significativa das proteínas, calorias e outros nutrientes, da dieta da população mundial. Nesta parcela destacam-se os indianos, africanos e latino-americanos, sendo que para os brasileiros é praticamente a única leguminosa que aparece como componente da dieta diária e, portanto, responsável por grande parte do seu conteúdo protéico.

O valor biológico e nutricional das proteínas do feijão é limitado por vários fatores: quantidade limitante de aminoácidos sulfurados, baixa digestibilidade e baixa disponibilidade biológica dos aminoácidos limitantes, assim como pela presença de proteínas tóxicas e de outros fatores antinutricionais, especialmente quando crus ou mal processados.

O feijão, apesar de sua importância como alimento e dos problemas que apresenta quanto à sua utilização, ainda não foi suficientemente estudada sua marcação isotópica com nitrogênio 15 (^{15}N), com vistas aos estudos de metabolismo, protéico e medidas de índices de qualidade de suas proteínas.

Este trabalho procurou verificar se a marcação com ^{15}N obtida no feijão integral é a mesma na proteína e nas frações protéicas extraídas; e ainda estudar a diluição isotópica do ^{15}N ocorrida na digestibilidade *in vitro* pela autodigestão das enzimas utilizadas, bem como pela influência da marcação do nitrogênio originalmente solúvel existente no feijão, possibilitando desta forma, o acréscimo de novos conhecimentos sobre o assunto abordado. Para tal utilizou-se, além de métodos convencionais para avaliação deste índices de qualidade protéica, como a hidrólise enzimática *in vitro* e determinações químicas auxiliares, métodos não-convencionais, como a marcação isotópica das proteínas do feijão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar se a marcação com ^{15}N dos grãos, obtida por adubação do feijoeiro com fertilizante enriquecido no isótopo estável é a mesma na proteína e nas frações protéicas extraídas do feijão; e da diluição isotópica do ^{15}N ocorrida pela autodigestão das enzimas utilizadas na digestibilidade *in vitro*.

2.2 Específicos

2.2.1 Obtenção do extrato protéico total e das frações albumina e globulina da farinha integral de feijão mediante extração com NaCl 0,5M e fracionamento.

2.2.2 Determinação da digestibilidade *in vitro* da farinha integral, do extrato protéico total e das frações protéicas do feijão, albumina e globulina, pelo método da digestão por pepsina e pancreatina, e determinação da metionina potencialmente disponível *in vitro*, a título de controle.

2.2.3 Determinação da abundância de ^{15}N da farinha integral, extrato protéico total, das frações protéicas e dos digeridos obtidos na digestibilidade *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O pioneirismo de Schoenheimer no emprego de isótopos para o estudo do metabolismo protéico, trouxe contribuições importantes para a disseminação do uso destes elementos. Em artigo de 1938 (SCHOENHEIMER & RITTENBERG, 1938), são apontadas as indicações dos diferentes isótopos usados até então: o deutério (hidrogênio 2) e o nitrogênio 15 (^{15}N). Foi através da constatação de que a concentração do deutério é a mesma, quer seja na água, ou nos compostos orgânicos que usam em seu metabolismo, que surgiu a indicação de que o metabolismo celular não é seletivo entre isótopos; ou seja, apesar de a diferença física entre os mesmos (diferentes números de nêutrons e, portanto, diferente número de massa), bioquimicamente são usados sem distinção.

Através da detecção destes elementos é possível aprofundar o conhecimento sobre proteínas e aminoácidos com grande refinamento e precisão, o que contribui para o esclarecimento dos mecanismos por meio dos quais estes compostos interagem com o organismo vivo. O uso de aminoácidos marcados proporcionou o conhecimento da dinâmica de degradação e síntese protéica, o que permitiu o estabelecimento do conceito de "pool" metabólico, definido como "mistura de compostos, derivados da dieta ou da degradação tissular, a qual o animal emprega para síntese dos constituintes celulares" (SPRINSON & RITTENBERG, 1949). O uso de isótopos como traçadores tem sido empregado para identificar as vias metabólicas de aminoácidos e nitrogênio em indivíduos sadios e enfermos, a fim de subsidiar o estabelecimento dos requerimentos de proteína e aminoácidos em ambas as situações (YOUNG, 1981; YOUNG, 1987).

Algumas condições para o emprego de isótopos em estudos de metabolismo são de vida útil duradoura e inocuidade. Para estudos *in vivo* e, principalmente com humanos, o uso de isótopos estáveis (como o hidrogênio 2, o carbono 13, o nitrogênio 15 e o oxigênio 18) apresenta-se como opção segura do ponto de vista ético devido à inocuidade e ao tempo de vida infinito que permite a condução de experimentos metabólicos (SCHOENHEIMER & RITTENBERG, 1938; WATERLOW et alii., 1978; YOUNG, 1981), com a qualidade de não alterá-los (WUTZKE et alii., 1987).

Outra característica de interesse refere-se à estabilidade do isótopo durante os processos biológicos. Assim, o fato do oxigênio 18 apresentar-se em geral em grupos altamente reativos (-COOH, -OH, -C=O, entre outros) favorece a perda do isótopo. Quanto a isso, o ^{15}N apresenta melhores indicações para o estudo de qualidade protéica: além de distribuir-se na molécula ampla e difusamente, sua ligação é bastante estável (SCHOENHEIMER & RITTENBERG, 1938).

O estudo do metabolismo protéico através do uso do ^{15}N baseia-se na quantidade do isótopo como produto final no material de excreção do organismo (fezes e urina), o que pode ser feito de duas formas. Na primeira, o cálculo baseia-se na quantificação do traçador no produto final em diferentes tempos e após uma única dose, o que é definido como método compartimental; no segundo, conhecido como método estocástico, a quantificação considera a excreção cumulativa do isótopo, a partir de uma dose simples ou a partir da estabilização decorrente de uma administração contínua (WATERLOW et alii, 1978). Contudo, estas duas propostas consideram como produto final o ^{15}N presente sob a forma de amônia ou uréia, que medem fluxos originários de "pools" de aminoácidos livres diferentes (WATERLOW, 1984). Estes problemas podem ser significativamente diminuídos

se, em lugar de administrar o ^{15}N através de aminoácidos específicos, todos os aminoácidos estiverem igualmente marcados com o isótopo (WATERLOW, 1981) e ainda, que se quantifique todo o nitrogênio excretado. Durante muito tempo, não foi isto o que ocorreu, e, ainda hoje, os aminoácidos marcados representam um bom instrumento para a investigação do metabolismo protéico em humanos através de modelos biológicos (OLESEN et alii, 1954; WU et alii, 1959; WU & SENDROY, 1959; STEIN et alii, 1976; OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986a). Dentre os aminoácidos, ^{15}N -glicina parece ser o mais amplamente empregado, o que pode ser explicado pela sua maior disponibilidade e mais baixo custo (WATERLOW, 1981). Com este aminoácido marcado com ^{15}N , WU e BISHOP (1959) demonstraram que sua aplicação e dosagem através de três produtos finais de eliminação (amônia, ácido hipúrico e uréia), dava origem a curvas de comportamento bastante distintos. Os autores puderam concluir que a transferência do grupo $-\text{NH}_2$ para os outros aminoácidos não é rápida a ponto de qualificar esta técnica como geradora de um "pool" de aminoácidos marcados logo após a administração do marcador. Desta forma, quando um aminoácido marcado, como a ^{15}N -glicina, é empregado em ensaios biológicos, há que se considerar que, a rigor, os padrões de excreção do isótopo refletem aspectos particulares de seu metabolismo, pelo menos até que haja tempo para que as reações de transaminação possam disseminar o isótopo entre os demais aminoácidos (WU et alii, 1959; WU & BISHOP, 1959; WU & SENDROY, 1959). Estima-se que o "pool" metabólico de nitrogênio hepático atinja o equilíbrio com o ^{15}N entre 6 e 10 horas após a administração do isótopo, seja esta administração feita via oral ou intravenosa (STEIN et alii, 1976). Apesar destas considerações, WUTZKE e seus colaboradores não encontraram diferenças significativas entre os resultados

obtidos através da ^{15}N -glicina em relação à proteína de levedura uniformemente marcada com ^{15}N , para o estudo da cinética de eliminação de nitrogênio em crianças (WUTZKE et alii, 1983).

Em relação ao uso de isótopos para estudo do valor nutritivo e da influência de leguminosas sobre a excreção de nitrogênio em modelos biológicos, existem poucos dados disponíveis. FAIRWEATHER-TAIT et alii (1983) publicaram os resultados de seus estudos com timidina marcada com trítio (^3H). Os autores administraram este precursor do DNA por injeção intraperitoneal com o objetivo de observar a dinâmica de excreção fecal do isótopo em ratos alimentados com dietas contendo feijão cozido (*Phaseolus vulgaris*), estabelecendo comparações com um grupo controle, alimentado com dieta contendo caseína como fonte protéica. Seus resultados permitiram observar que a eliminação de DNA da mucosa por ação da dieta com feijão foi 35% maior do que a referente ao grupo controle.

A técnica de marcação do animal foi também empregada para a avaliação da digestibilidade das proteínas do feijão-fava (*Vicia faba*) usando outro isótopo, o ^{15}N . Neste caso, o animal incorporou o isótopo por ingestão de cloreto de amônio enriquecido com 96 átomos % de ^{15}N em excesso misturado à sua dieta. A metodologia empregada para a determinação do nitrogênio endógeno considerou que a abundância de ^{15}N nas proteínas pancreáticas e nos demais órgãos do sistema digestivo é bastante semelhante àquela encontrada na urina destes animais, o que permite que a determinação da porcentagem de ^{15}N em excesso na urina seja uma boa indicação da eliminação do isótopo neste sistema. Os resultados demonstraram valores de digestibilidade superiores quando calculados pela técnica da marcação isotópica, em relação à técnica do balanço de nitrogênio total (BERGNER et alii, 1984).

A utilização do ^{15}N como marcador de proteínas de leguminosas através da incorporação pelo vegetal durante seu desenvolvimento para estudo de seu valor nutricional foi proposta por OLIVEIRA e SGARBIERI (1986b). Estes autores determinaram, por meio da marcação isotópica, a contribuição do nitrogênio de origem endógena para o nitrogênio total encontrado nas fezes e urinas de ratos. Desta forma, compararam indicadores de qualidade protéica (digestibilidade e valor biológico), obtidos através do balanço de nitrogênio total (aparentes) com os determinados pela correção com o nitrogênio excretado por grupo de animais em dieta aprotéica (verdadeiros) e ainda com aqueles obtidos através da correção com os nitrogênios endógenos determinados pela excreção do isótopo (aos quais propuseram a denominação de "reais"). Sem a interferência do material de origem endógena, os valores para digestibilidade e valor biológico reais de proteína de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) encontrados foram superiores aos aparentes e verdadeiros, indicando a impropriedade da utilização da dieta aprotéica para ensaios nutricionais de leguminosas. Isto se deve à já referida estimulação que as proteínas exercem sobre a eliminação de nitrogênio endógeno (OLIVEIRA e SGARBIERI, 1986a; OLIVEIRA e SGARBIERI, 1986b; OLIVEIRA et alii., 1988). Posteriormente, LANFER MARQUEZ e LAJOLO (1988) utilizando NH_4Cl e Na_2SO_4 como fonte dos isótopos ^{15}N e ^{35}S (este último radioativo) durante o cultivo, obtiveram grãos de feijão-comum marcados e procederam a avaliação das excreções de nitrogênio total e marcado, em dietas contendo a farinha integral ou as frações globulina e albumina, após autoclavagem (121 graus célsius por 30 minutos). Os resultados mostraram valores de digestibilidade reais superiores as aparentes e indicam aumento da excreção de nitrogênio endógeno decorrente da influência do feijão.

O ^{15}N é o isótopo estável mais difundido para estudos de metabolismo protéico (FERN et alii, 1981), para o que contribui sua inocuidade em estudos humanos. Esta não era a realidade antes da transposição de duas limitações que justificavam a ampla divulgação de isótopos radioativos: a dificuldade de acesso a fontes enriquecidas para síntese química ou bioquímica, e de métodos analíticos disponíveis (BIER et alii, 1981). O advento da cromatografia gasosa por espectrometria de massa ("gas chromatography-mass spectrometry", ou GCMS), tornou a detecção de isótopos estáveis acessível com grande grau de precisão (BIER & MATHEWS, 1982; WATERLOW, 1984).

A abundância natural do ^{15}N é de 0,375 átomos % e o nível de precisão da análise é de 0,025 átomos % em excesso, tornando viável a medida do isótopo após a diluição naturalmente decorrente da distribuição do traçador durante o metabolismo (HALLIDAY & READ, 1981; HALLIDAY, 1981; BIER & MATHEWS, 1981; BIER & MATHEWS, 1982).

Não foi encontrado, na literatura, referência a respeito do ^{15}N sobre o assunto objetivo deste trabalho. Entretanto, o assunto reveste-se de grande importância em nutrição experimental, pois marcações diferentes em frações protéicas poderiam levar a resultados falseados na determinação de índices de qualidade protéica, como a digestibilidade e o valor biológico, quando estes são determinados por balanço de nitrogênio e diluição isotópica das excreções.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Fontes Protéicas

4.1.1.1 Feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar Piratã 1 cru, integral, liofilizado, marcado isotopicamente com 1,385 átomos% de ^{15}N no N- total, correspondente a uma marcação de 1,010 átomos % de ^{15}N da sua abundância natural, obtida por meio de adubação de solo e foliar com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contendo 10 átomos% ^{15}N em excesso. O feijão foi obtido através do cultivo das plantas em vasos, em estufa, na Fazenda Experimental Santa Eliza, mais particularmente na seção de Leguminosas, do Instituto Agronômico de Campinas. Os grãos foram colhidos no estádio seco.

4.1.1.2 Extrato protéico, frações protéicas globulina e albumina obtidos do feijão integral liofilizado, por extração com NaCl 0,5 M (ver figura 1).

4.2 Métodos

4.2.1 Determinações Químicas

4.2.1.1 Nitrogênio: determinado pelo método semi-micro Kjeldahl (CUNNIFF, 1995).

4.2.1.2 Proteína: determinada, em termos de "proteína bruta", pelo produto entre a percentagem de nitrogênio e o fator de conversão de nitrogênio para proteína 5,4, no caso do feijão (MOSSÉ, 1990).

4.2.1.3 Nitrogênio 15: determinado na farinha integral e frações protéicas, a partir dos titulados obtidos nas determinações de nitrogênio, adotando-se os procedimentos recomendados por BREMNER (1965) e pela INTERNATIONAL

ATOMIC ENERGY AGENCY (1972), utilizando-se espectrômetro de massa. Na análise de nitrogênio 15, variando-se a intensidade do campo magnético, focaliza-se o número de massa 28 constituído pelos íons ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$)⁺ e os de massa contados pelos íons ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$)⁺.

Com a intensidade das correntes provenientes desses dois íons, pode-se determinar a porcentagem de N^{15} pela expressão:

$$\text{Átomos \% de } \text{N}^{15} = \frac{100}{2R + 1}$$

onde R é a relação entre a intensidade dos feixes de íons de massa 28 e 29 ($R = ^{14}\text{N}^{15}\text{N}/^{14}\text{N}^{14}\text{N}$).

4.2.1.4 Digestibilidade *in vitro*: determinada nas fontes protéicas, mediante a digestão da amostra pela pepsina (SIGMA, 1:10.000) mais pancreatina (MERCK, 350 FIP-V/g protease; 7500/g lipase; 7500/g amilase) utilizada por AKESON & STAHMANN (1964), modificada por OLIVEIRA et alii (1987), e o cálculo descrito por WATERMAN & JOHNS (1921) com a correção do nitrogênio solúvel da amostra.

4.2.1.5 Determinação de Metionina Potencialmente Disponível

A metionina liberada no sobrenadante, na forma livre ou em peptídeos solúveis, durante a hidrólise enzimática, foi determinada à título de controle, de acordo com a modificação do método colorimétrico de MCCARTHY & SULLIVAN (1941), proposta por GENOVESE & LAJOLO (1993). A 1 mL do hidrolisado adicionou-se 0,25 mL de NaCl 5N, 25 µL de nitroprussiato de sódio 10%, 0,5 mL de glicina 3%, sendo o meio acidificado através da adição de 0,5 mL de ácido fosfórico 85% e, após 5 minutos de reação, a absorbância lida a 520 nm. A leitura

rápida é importante com vistas a evitar a interferência de histidina e de triptofano presente no meio de reação. Por outro lado, utilizou-se a glicina para evitar interferência da histidina devido à reação com o nitroprussiato de sódio (GENOVESE & LAJOLO, 1993).

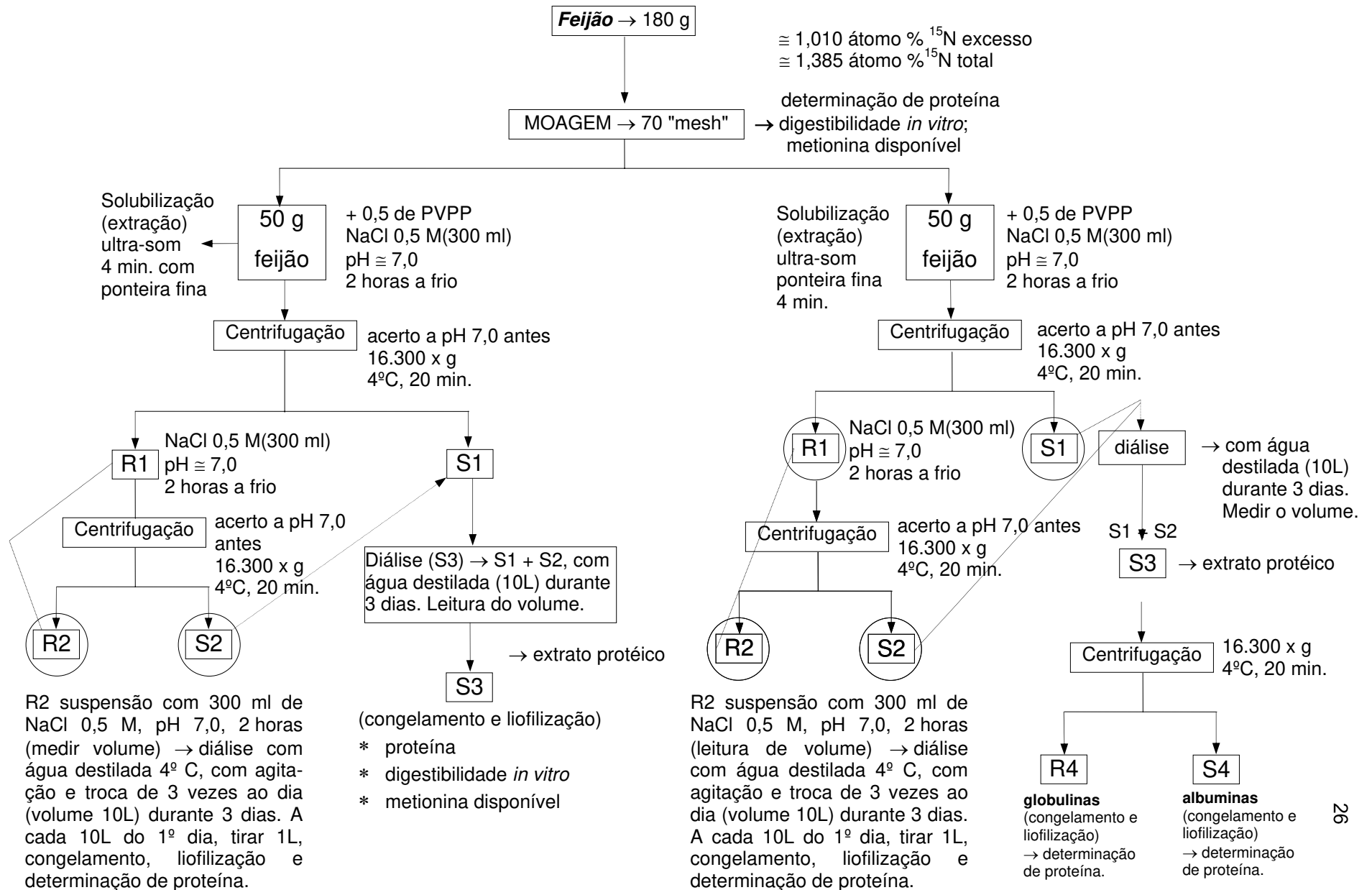
4.2.2 Obtenção das proteínas isoladas do feijão

O feijão em grão foi moído até uma farinha de granulometria 70 mesh e as proteínas extraídas a partir desta farinha, em solução de NaCl 0,5M, segundo WHITAKER & SGARBIERI (1981). A farinha mais 1% (p/p) de polivinilpolipirrolidona (Sigma) foram misturadas à solução salina de NaCl 0,5 N, na proporção de 1:6 (p/v). A utilização de polivinilpolipirrolidona deve-se ao fato de complexar-se com os taninos, arrastando-os ao resíduo da extração, evitando que reajam com as proteínas e, conseqüentemente, diminua a digestibilidade das mesmas. A mistura foi inicialmente submetida à vibração ultra-sônica (vibrador ultra-sônico Bronwill, modelo Biosonik IV) por 4 minutos e, após, à agitação magnética por 2 horas, com pH ajustado a 7,00 (OLIVEIRA et alii, 1987). A suspensão formada foi centrifugada a 16.300 x g, 20 min., 4º C (centrífuga Sorwall, modelo RC₂-B) e o sobrenadante dialisado, também a pH 7,0, para eliminar o NaCl e compostos de baixo peso molecular (PM < 8.000). O extrato dialisado foi congelado e liofilizado (liofilizador VIRTIS, modelo 10-146Mr-BA), constituindo o "extrato protéico do feijão". No caso de se fazer nova centrifugação do extrato dialisado a 16.300 g, 30 min., 4º C, separou-se duas frações quanto à solubilidade: uma insolúvel em água, denominada "fração globulina" e outra solúvel em água denominada "fração albumina" que, por sua vez, foram congeladas e liofilizadas. OLIVEIRA et alii (1987) verificaram que, nestas condições a pH 7,0, a fração globulina obtida era

aparentemente livre de albumina, mas a fração albumina possuía contaminação por globulinas parcialmente solúveis em água.

O fracionamento protéico foi feito conforme a figura 1 mostrada na página 26. No lado esquerdo da figura, está representada a obtenção do extrato protéico total. No lado direito da figura está representada a obtenção das frações isoladas albumina e globulina.

Figura 1. Fracionamento protéico a partir da farinha crua de feijão-comum, cultivar Piratã 1 (*Phaseolus vulgaris*)



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da amostra

A farinha de feijão cru, cultivar Piratã 1, apresentou teor de proteína bruta de $20,56 \pm 0,04\%$, o que está de acordo com MARQUEZ & LAJOLO (1981) que encontraram para o referido grão um teor de proteína bruta de 21,1%. MEINERS et alii (1976) encontraram uma variação no teor de proteína bruta para o feijão-comum entre 18,8% a 21,5%.

5.2 Fracionamento protéico da farinha crua, cultivar Piratã 1

5.2.1 Teores protéicos do extrato protéico total, das frações isoladas albumina e globulina e do resíduo da extração

Para o estudo do balanço de massa da extração e contribuição protéica de cada fração, foram realizadas quantitativamente três extrações, uma extração a partir de 50g de farinha de feijão-comum e duas extrações a partir de 20g de farinha, utilizando-se as mesmas condições de extração e ambientais, o que resultou num rendimento médio de 65,8% de extração da proteína, referente ao extrato protéico total (ver figura 2, como exemplo). Uma das extrações foi feita com o propósito de obtenção das frações albumina e globulina isoladas, onde o rendimento obtido foi menor, 53,7%, conforme disposto na figura 3.

O esquema da extração a partir de 50g de farinha crua para obtenção do extrato protéico total, por razões de brevidade, não foi apresentado, uma vez que as outras duas extrações foram a partir de 20g de farinha crua e eram mais convenientes para fins comparativos, como também os valores encontrados em tal extração foram muito semelhantes àqueles encontrados na extração a partir de 20g para obtenção do extrato protéico total, o que ficaria repetitivo.

O balanço de massa obtido foi igual nas duas extrações, a partir de 20 g de farinha, porém o rendimento protéico foi menor na extração para obtenção das frações albumina e globulina isoladas, provavelmente devido a uma maior manipulação, o que veio inclusive a prejudicar a realização de análises posteriores.

Verificando-se a porcentagem de proteína das frações do cultivar estudado, separadas com base na solubilidade característica, observou-se que os valores estiveram entre 51,6% para as albuminas e 58,1% para as globulinas com destaque para a fração globulina que apresentou maior quantidade de proteínas. Estes dados concordam com os relatados por diversos autores (OSBORNE, 1894; SMITH et alii, 1959; SGARBIERI et alii, 1979; MARQUEZ & LAJOLO, 1981; SGARBIERI & GALEAZZI, 1990) que também extraíram proteínas de feijão com solução de NaCl.

Em relação ao extrato protéico total e o resíduo, foram encontrados os valores de teores de proteína de 56,6% e 6,4% respectivamente.

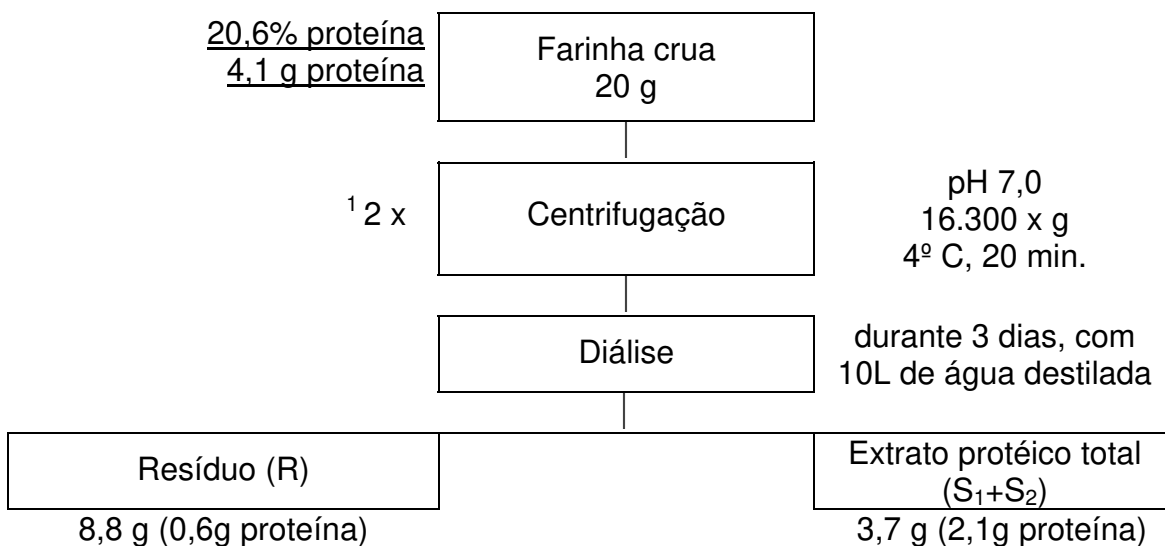
Os dados obtidos quanto à quantidade de proteína obtida da extração nas frações isoladas albumina e globulina, extrato protéico total e resíduo estão dispostos na tabela 1.

TABELA 1. Teor protéico expresso em g/100g das frações isoladas albumina e globulina, extrato protéico total e do resíduo da extração por NaCl 0,5 M, da farinha de feijão cru, cultivar Piratã 1 (*Phaseolus vulgaris*).

FRAÇÕES	% NITROGÊNIO	% PROTEÍNA (N X 5,4)
Extrato protéico total (S ₁ + S ₂)	10,48	¹ 56,6 (0,21)
Albumina (ALB)	9,55	51,6 (0,52)
Globulina (GLO)	10,76	58,1 (0,74)
Resíduo (R)	1,21	6,4 (0,03)

¹ Os números entre parênteses correspondem aos desvios-padrões dos resultados em relação à média apresentada (no mínimo n=3).

FIGURA 2. Balanço de massa e proteínas extraídas da farinha crua, cultivar Piratã 1 (*Phaseolus vulgaris*) com NaCl 0,5M, para obtenção do extrato protéico total e resíduo.



$$\text{Rendimento} = 0,6 \text{ g} + 2,1 \text{ g} = 2,7 \text{ g}$$

$$\text{Rendimento} = \frac{2,7 \text{ g}}{4,1 \text{ g}} \times 100$$

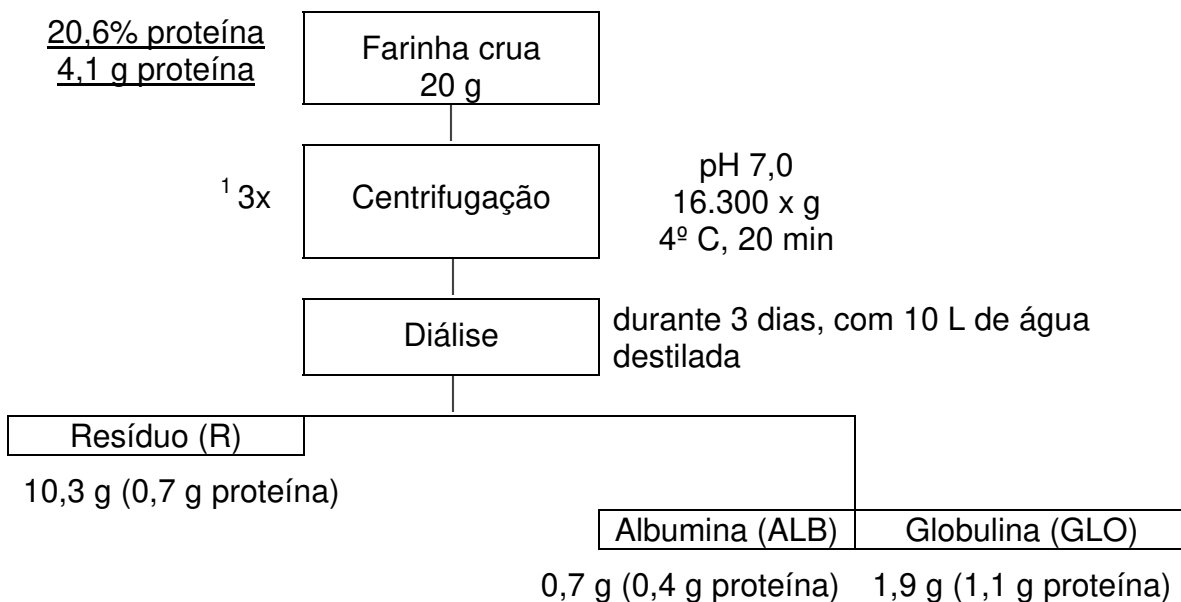
$$\text{Rendimento} = 65,8\% \text{ de proteína}$$

$$\text{Balanço de massa} = 8,8 \text{ g} + 3,7 \text{ g}$$

$$\text{Balanço de massa} = 12,5 \text{ g} \cong 13 \text{ g}$$

¹ Foram realizadas duas extrações, utilizando as mesmas soluções extratoras e sob condições ambientais idênticas.

FIGURA 3. Balanço de massa e proteínas extraídas da farinha crua de feijão-comum, cultivar Piratã 1 (*Phaseolus vulgaris*), com 0,5 M NaCl, para obtenção das frações albumina e globulina isoladas e resíduo.



$$\text{Rendimento} = 0,7 \text{ g} + 0,4 \text{ g} + 1,1 \text{ g} = 2,2 \text{ g}$$

$$\text{Rendimento} = \frac{2,2 \text{ g}}{4,1 \text{ g}} \times 100$$

$$\text{Rendimento} = 53,7 \% \text{ de proteína}$$

$$\text{Balanço de massa} = 10,3 \text{ g} + 0,7 \text{ g} + 1,9 \text{ g}$$

$$\text{Balanço de massa} = 12,9 \text{ g} \cong 13 \text{ g}$$

¹ Foram realizadas duas extrações, utilizando as mesmas soluções extratoras e sob condições ambientais idênticas, e mais uma centrifugação para obtenção das frações protéicas albumina e globulina.

5.3 Caracterização bioquímica da proteína da farinha crua e das frações isoladas

5.3.1 Digestibilidade in vitro da proteína da farinha integral crua e do extrato protéico total

A determinação da digestibilidade *in vitro* das proteínas da farinha do feijão cru, cultivar Piratã 1, e do extrato protéico total, utilizando-se a hidrólise enzimática pelo sistema pepsina e pancreatina, mostrou-se interessante, uma vez que foi empregada tanto para a avaliação da digestibilidade, como para a determinação da metionina potencialmente disponível *in vitro* das proteínas.

Os valores de digestibilidade protéica da farinha crua e do extrato protéico total com base no sistema pepsina e pancreatina, foram respectivamente $32,4 \pm 7,8$ e $44,1 \pm 3,0$. OLIVEIRA et alii. (1987) encontraram valores de 33,4% para digestibilidade da farinha crua integral e 62,6% para a proteína isolada precipitada no ponto isoelétrico, para o feijão-comum, cultivar Carioca 80.

Os dados referentes à digestibilidade *in vitro* das frações isoladas albumina e globulina não foram apresentados, uma vez que os valores encontrados apresentaram variações altas (desvios-padrões elevados) para uma mesma fração protéica. Por outro lado, não se dispunha de material suficiente para uma análise confirmatória.

5.3.2 Metionina quimicamente disponível na proteína da farinha integral de feijão-comum cru, cultivar Piratã 1, no extrato protéico total e nas frações protéicas isoladas albumina e globulina

A tabela 2 mostra os teores em gramas de metionina liberada por 100 g de proteína no transcurso da digestão *in vitro* da farinha crua e de suas frações protéicas. Observou-se que os valores mais elevados foram do extrato protéico total, de 0,41 g Met/100 g proteína e da fração globulina 0,41 g Met/100 g proteína e o mais baixo aquele da farinha crua, de 0,30 g Met/100 g proteína.

Em relação ao cultivar Piratã 1, POMPEU & ROSTON (1988) relataram um teor de metionina biodisponível de 0,39 g Met/100 g proteína.

OLIVEIRA et alii (1987) trabalhando com o cultivar Carioca 80 verificaram teores altos de metionina disponível *in vitro* em farinha integral e isolado protéico, no ponto isoelétrico, respectivamente de 1,36 g Met/16 g N e 1,77 g Met/16 g N. TEZOTO & SGARBIERI (1990) também trabalhando com o cultivar Carioca 80, em base seca, encontraram um valor de metionina biodisponível de 1,55 g Met/16 g N, para a farinha integral.

SGARBIERI & GALEAZZI (1990) observaram uma variação no teor de metionina total, em base seca, para o feijão-comum entre 0,40 g Met/16 g N e 1,73 g Met/16 g N e para o cultivar Piratã 1, um valor de 1,27 g Met/16 g N.

TABELA 2. Metionina quimicamente disponível *in vitro* na farinha integral de feijão-comum cru, cultivar Piratã 1, no extrato protéico total e nas frações protéicas isoladas albumina e globulina, expressa em g Met/100 g proteína.

FRAÇÕES	METIONINA (g Met/100 g proteína)
Farinha integral	¹ 0,30 (0,04)
Extrato protéico total (S ₁ + S ₂)	0,41 (0,01)
Albumina (ALB)	0,37 (0,01)
Globulina (GLO)	0,41 (0,05)

¹ Os números entre parênteses correspondem aos desvios-padrões dos resultados em relação à média apresentada. Valores determinados em triplicata (no mínimo n=3).

5.4 Marcações isotópicas com ^{15}N

As marcações isotópicas obtidas estão representadas na tabela 3. Os resultados referentes à farinha integral crua, ao extrato protéico total e às frações isoladas albumina e globulina foram, respectivamente: $1,394 \pm 0,011$; $1,404 \pm 0,012$; $1,399 \pm 0,007$; $1,399 \pm 0,028$ átomos % de ^{15}N , não havendo diferença estatística entre as mesmas ($P > 0,05$). Entretanto, foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as marcações acima citadas e a marcação encontrada para o resíduo da extração, que foi de $0,969 \pm 0,084$ átomos % ^{15}N e o nitrogênio originalmente solúvel da amostra que apresentou um valor de $0,923 \pm 0,007$ átomos % ^{15}N .

O digerido da farinha integral apresentou um valor de $1,026 \pm 0,014$ átomos % de ^{15}N , o que indica que efetivamente ocorreu uma autodigestão relativamente alta das enzimas utilizadas para a obtenção da digestibilidade *in vitro*, uma vez que não estão marcadas e, conseqüentemente, foram em parte, responsáveis pela diluição isotópica encontrada. A diluição isotópica encontrada nas substâncias nitrogenadas existentes no digerido do branco da farinha integral (farinha integral que foi digerida sem ação das enzimas) indicou que tais substâncias são marcadas em menor magnitude do que o próprio grão e suas proteínas, o que também influenciou no resultado do digerido da farinha integral. O digerido do extrato protéico total apresentou um valor de $1,067 \pm 0,009$ átomos % ^{15}N . Os valores estão indicando a existência de diluição isotópica dos digeridos do extrato protéico total, em relação à marcação isotópica da farinha crua, o que foi devido à autodigestão das enzimas e ao nitrogênio originalmente solúvel da farinha, conforme já descrito.

Também, com relação à marcação com nitrogênio ^{15}N , os dados referentes aos digeridos das frações isoladas albumina e globulina não foram apresentados, à semelhança do ocorrido com os resultados da digestibilidade *in vitro*, uma vez que os valores encontrados também apresentaram variações altas para uma mesma fração protéica, e igualmente não se dispunha de material suficiente para uma análise confirmatória.

Pelo exposto, ficou demonstrado que experimentos biológicos nos quais a matéria-prima alimentar utilizada como única fonte protéica marcada com nitrogênio ^{15}N , em uma dieta balanceada, a ser utilizada em experimentação nutricional, devem ser vistos com certa cautela. Isso porque as proteínas constituintes de tal matéria-prima não apresentam marcação homogênea com o isótopo, pelo menos no caso do feijão-comum, como foi visto. Assim, em se tratando da utilização da farinha integral da matéria-prima, como única fonte protéica da dieta, ocorrerá uma diluição isotópica nas fezes (OLIVEIRA & SGARBIERI, 1986_b) que não dependerá apenas da secreção e excreção de nitrogênio endógeno ou corporal do animal utilizado no experimento. Irão também contribuir para esta "diluição isotópica", o nitrogênio originalmente solúvel da fonte protéica marcada com menor abundância de ^{15}N , bem como aquelas proteínas que geralmente ficam no resíduo de extração protéica por soluções salinas, relativamente aos extratos ou isolados protéicos e frações obtidas por diversas metodologias, sendo mais comumente a solubilidade diferencial. Assim, as diluições isotópicas, neste caso particular, tenderão a apresentar nas estimativas de secreções e excreções dos animais experimentais, valores superiores àqueles que seriam efetivamente devidos ao nitrogênio corporal.

TABELA 3. Marcações isotópicas com ^{15}N referentes à farinha integral crua de feijão-comum, cultivar Piratã 1 (*Phaseolus vulgaris*), suas respectivas frações e digeridos obtidos pelo tratamento in vitro com pepsina e pancreatina.

MATERIAL	ÁTOMOS % ^{15}N
Farinha integral	¹ 1,394 (0,011)
Extrato protéico total (S1 + S2)	1,403 (0,012)
Fração globulina (GLO)	1,399 (0,070)
Fração albumina (ALB)	1,399 (0,028)
Resíduo (R)	0,969 (0,084)
Nitrogênio originalmente solúvel	0,923 (0,007)
Digerido da farinha integral	1,026 (0,014)
Digerido do extrato protéico total	1,067 (0,009)

¹ Os números entre parênteses correspondem aos desvios-padrões dos resultados em relação à média apresentada. Valores determinados em triplicata.

6 CONCLUSÕES

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

6.1 As marcações isotópicas referentes à farinha crua, ao extrato protéico total e às frações isoladas albumina e globulina não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$). Entretanto, as marcações isotópicas referentes ao nitrogênio do resíduo da extração e ao nitrogênio originalmente solúvel do feijão apresentaram diferenças significativamente inferiores ($P < 0,05$) em relação às primeiras.

6.2 Os digeridos *in vitro* referentes à farinha integral e ao extrato protéico total apresentaram diluição isotópica em relação à marcação da farinha crua e frações protéicas originais, o que foi devido à autodigestão das enzimas e ao nitrogênio originalmente solúvel da amostra, que apresentou marcação isotópica menor.

6.3 Pôde ser inferido que a farinha integral do feijão-comum utilizado como única fonte protéica em dietas para ratos, marcadas com nitrogênio 15, mostrará uma diluição isotópica nas fezes que não dependerá apenas da secreção e excreção de nitrogênio endógeno ou corporal, como também do fato de que tanto o nitrogênio originalmente solúvel da fonte protéica, como as proteínas do resíduo da extração por soluções salinas, apresentaram marcações menores. Assim, as diluições isotópicas tenderão a apresentar valores superiores àqueles que seriam efetivamente devidos ao nitrogênio corporal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKESON, W. R.; STAHPMAN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.83, p. 257-261, 1964.
2. CUNIFF, P. (Ed.) **Official methods of analysis of A.O.A.C. International**. 16.ed. Arlington: A.O.A.C. International, 1995, Chapt. 39, p. 7-8.
3. BERGNER, H.; SEIDLER, W.; SIMON, O.; SCHMANDKE, H. Digestibility and dietary quality of non-acetylated and acetylated *Vicia faba* proteins in maintenance. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 28, n. 3, p. 156-163, 1984.
4. BIER, D. M.; MATHEWS, D. E. Practical advantages of gas chromatography-mass spectrometry for stable isotope measurement in biological sample. In: WATERLOW, J. C.; STEPHEN, J. M. (Ed.) **Nitrogen metabolism in man**. London: Applied Science, 1981. p. 289-294.
5. BIER, D. M.; MATHEWS, D. E. Stable isotope tracer methods for *in vivo* investigations. **Federation Proceedings**, Washington, v. 41, n. 10, p. 2679-2685, 1982.
6. BREMNER, J. M. Isotope ratio analysis of nitrogen in nitrogen 15 tracer investigations. In: BACK, C. A.; ENSMINGER, L. E.; CLARK, F. E. (Ed.) **Methods of soil analysis**. Madison: Am. Soc. Agronomy, 1965. v. 2, p. 1265-1286.

7. FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; GEE, J. M.; JOHNSON, I. T. The influence of cooked Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) on intestinal cell turnover and faecal nitrogen excretion in the rat. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, Great Britain, v. 49, n. 2, p. 303-312, 1983.

8. FERN, E. B.; GARLICK, P. J.; McNURLAN, M. A.; WATERLOW, J.C. The excretion of isotope in weat and ammonia for estimating protein turnover in man with [¹⁵N] glycine. **Clinical Science**, Colchester, v. 61, n. 2, p. 217-228, 1981.

9. GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Utilization of the colorimetric method of McCarthy; Sullivan for the determination of biodegradable methionine in bean proteins (*Phaseolus vulgaris*, L.) **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 36, p. 545-566, 1993.

10. HALLIDAY, D. Advances in the measurement of stable isotopes. In: WATERLOW, J. C.; STEPHEN, J. M. (Ed.) **Nitrogen metabolism in man**. London: Applied Science, 1981, p. 295-302.

11. HALLIDAY, D.; READ, W.W.C. Mass spectrometric essay on stable isotopic enrichment for the estimation of protein turnover in man. **Proceedings of the Nutrition Society**. Cambridge, v. 40, n. 3, p. 321-324, 1981.

12. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Tracer manual on crops and soils**. Vienna, 1972. (Bulletin series, nº 172).

13. KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). **Economic Botany**, New York, v.19, p. 358-368, 1965.

14. LANFER-MARQUEZ, U. U.; 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. (Ed.) **Advances in bean research: chemistry and nutrition technology**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1988. p. 35-43. Trabalho apresentado no I Latin-American and Caribbean Seminar on Recent Advances in Research.
15. MARQUEZ, U. M. L.; LAJOLO, F. M. Composition and digestibility of albumin, globulins, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 29, n. 5, p. 1068-1074, 1981.
16. MCCARTHY, T. E.; SULLIVAN, M. X. A new and highly specific colorimetric test for methionine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 141, n. 1, p. 871-876, 1941.
17. MEINERS, C. R.; DERISE, N. L.; LAU, H.C.; RITCHEY, S. J.; MURPHY, E. W. Proximate composition and yield of raw and cooked mature dry legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.24, n. 6, p.1122-1126, 1976.
18. MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seeds protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 1, p. 18-24, 1990.

19. OELSEN, K.; HEILSKOV, N. C. S.; SCHONHEYDER, F. The excretion of ^{15}N in urine after administration of ^{15}N -glycine. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 15, p. 95-107, 1954.
20. OLIVEIRA, A. C.; SGARBIERI, V. C. Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 116, n. 12, p. 2387-2392, 1986a.
21. OLIVEIRA, A. C.; SGARBIERI, V. C. The influence of rat endogenous nitrogen excretion on the assessment of bean protein quality. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 32, n. 4, p. 425-436, 1986b.
22. OLIVEIRA, A. C.; SGARBIERI, V. C.; VICTÓRIA, R. L.; CERRI, C. C. Avaliação biológica das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) utilizando carbono 14 e nitrogênio 15. In: LAJOLO, F. M.; LANFER MARQUEZ, U. M. (Ed.) **Advances in bean research: chemistry and nutrition technology**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1988. p. 35-43. Trabalho apresentado do I Latin-American and Caribbean Seminar on Recent Advances in Research.
23. OLIVEIRA, A. C.; SAWAZAKI, H. E.; GALEAZZI, M. A. M. Extração, caracterização parcial e aspectos nutricionais das proteínas do Feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*, L.) **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Guatemala, v. 37, n. 1, p. 88-100, 1987.

24. OSBORNE, T. B. The proteids of the Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) . **Journal of the American oil Chemists Society**, Champaign, v.16, p.633-643, 703-712, 757-764, 1984.
25. POMPEU, A. S.; ROSTON, A. J. **Feijoeiro**: Carioca 80 (sem halo). Departamento de Extensão Rural, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Secretaria da Agricultura, Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 1988 (Comunicado Técnico nº 74).
26. SCHOENHEIMER, R.; RITTEMBERG, D. The application of isotopes to the study of intermediary metabolism. **Science**, Washington, v. 87, n. 2254, p. 221-226, 1938.
27. SGARBIERI, V. C.; ANTUNES, P. L.; ALMEIDA, L. D. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L). **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n. 5, p.1306-1308, 1979.
28. SGARBIERI, V. C.; GALEAZZI, M. A. M. Quantification and some chemical and biochemical characterization of nitrogenous substances from varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 14, n. 3, p. 233-247, 1990.
29. SMITH Jr., C. R.; EARLE, F. R.; WOLFF, I. A.; JONES, Q. Comparison of solubility characteristics of selected seed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.7, n. 2, p.133-135, 1959.

30. SPRINSON, D. B.; RITTEMBERG, D. The rate of interaction of the amino acids of the diet with the tissue proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 180, p. 715-726, 1949.
31. STEIN, T. P.; LESKIW, M. L.; WALLACE, H. W. Equilibration of ^{15}N -labeled amino compounds in man. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 230, n. 5., p. 1326-1330, 1976.
32. TEZOTO, S. S.; SGARBIERI, V. C. Protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 4, p. 1152-1156, 1990.
33. WATERLOW, J. C. ^{15}N end-product methods for the study of whole body protein turnover. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 40, n. 3, p. 317-320, 1981.
34. WATERLOW, J. C. Protein turnover with special reference to man. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 69, p. 409-438, 1984.
35. WATERLOW, J. C.; GOLDEN, M. H. N.; GARLICK, P.J. Protein turnover in man measured with ^{15}N [nitrogen isotope] comparison of end products and dose regimes. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 235, n. 2, p. E165-E174, 1978.
36. WATERMAN, H. C.; JOHNS, C. O. Studies on the digestibility of proteins *in vitro*. I. the effect of cooking on the digestibility of *phaseolin*. **The Journal of Biological Chemistry**. Bethesda, v. 46, p. 9-17, 1921.

37. WHITAKER, J. R.; SGARBIERI, V. C. Purification and composition of the trypsin - chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris*, *L.* var. Rosinha G₂ (Chemical analysis of Kidney beans). **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 5, n. 3, p. 197-213, 1981.
38. WU, H.; BISHOP, C. W. Pattern of ¹⁵N excretion in man following administration of ¹⁵N labeled glycine. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 14, n. 1, p. 1-5, 1959.
39. WU, H.; SENDROY JR., J. Pattern of ¹⁵N excretion in man following administration of ¹⁵N labeled phenylalanine. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 14, n. 1, p. 6-10, 1959.
40. WU, H.; SENDROY JR., J.; BISHOP, C. W. Interpretation of urinary ¹⁵N excretion data following administration of ¹⁵N labeled amino acid. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 14, n. 1, p. 11-21, 1959.
41. WUTZKE, K.; HEINE, W.; DRESCHER, V.; RICHTER, I.; PLATH, C. ¹⁵N-labeled yeast protein, a valid tracer for calculating whole-body protein parameters in infants: a comparison between [¹⁵N]-yeast protein and [¹⁵N]-glycine. **Human Nutrition. Clinical Nutrition**. Westport, v. 37c, p. 317-327, 1983.
42. WUTZKE, K.; HEINE, W.; FRIEDERICH, M.; WALTHER, F.; MULLER, M.; MATENS, E. Excretion of ¹⁵N and incorporation into plasma proteins after high-dosage pulse labeling with various tracer substances in infants. **Human Nutrition. Clinical Nutrition**. Westport, v. 41c, p. 431-439, 1987.

43. YOUNG, V. R. Dynamics of human whole body amino acid metabolism: use of stable isotope probes and relevance to nutritional requirements. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 27, n. 5, p. 395-413, 1981.
44. YOUNG, V. R. 1987 McCollum Award Lecture. Kinetics of human amino acid metabolism: nutritional implications and some lessons. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 46, n. 5/6, p. 709-725, 1987.