

Valor nutritivo de frações proteicas isoladas do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)*

MORAES E SANTOS, T.**, DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil

RESUMO

Proteínas do feijão foram extraídas com solução de NaCl 1%, pH 8. Tratamento do extrato com solução de HCl até pH 4 e calor permitiram a obtenção de três frações proteicas de características físico-químicas diferentes com teor variando de 59.13 a 66, 49%. O rendimento de uma das frações (65%) foi duas vezes maior que das duas outras.

Estudos em ratos das três frações mostraram que o valor nutritivo era inferior ao do feijão cozido quando ambas as dietas eram suplementadas com DL metionina. Por outro lado, a digestibilidade das frações foi melhor que a do feijão cozido. Verificou-se que a suplementação com DL metionina parece não influenciar a digestibilidade das dietas.

A presença de fito-hemaglutinina nas frações e no feijão cozido foi estudada, verificando-se que a ação hemo-aglutinante encontrada no feijão cru não se apresentou em nenhuma fração. A atividade blastogênica foi encontrada em todas as frações, porém, com intensidade reduzida quando comparada com aquela do feijão cru.

INTRODUÇÃO

A deficiência de proteínas para a alimentação humana inclui-se entre os problemas mais sérios da atualidade. Esta falta de proteínas alimentares é considerada quanto aos aspectos de

* Este trabalho foi realizado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Proc. Biol. 70/273 - 1970.

** Endereço atual - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Bioquímica. Caixa Postal 2486 - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil.

Recibido: 10-2-1972.

quantidade, distribuição e qualidade. A América Latina, principalmente através de sua população infantil, sofre, visivelmente, as consequências desta deficiência.

Recursos tecnológicos têm sido usados para a obtenção de isolados e concentrados proteicos de produtos animais e vegetais (2, 3). Para isso, organismos internacionais destacam a importância de estudos de produtos regionais. Dêste modo, o feijão constituindo um produto de alto teor proteico (4) e sendo bem aceito pela população de grande parte da América Latina seria um produto recomendado. A exemplo do que se faz com a soja, também o feijão poderia servir à produção de isolados ou concentrados proteicos com a finalidade de enriquecer os alimentos (2).

Por outro lado, é necessário considerar que as proteínas do feijão, como a maioria das proteínas vegetais, apresentam um desequilíbrio em amino ácidos essenciais que deve ser corrigido e se mostram com um índice de digestibilidade inferior às proteínas animais (5).

Além disso, o feijão apresenta frações proteicas termolábeis de caráter anti-nutricional (6, 7). Estas substâncias já foram, em grande parte, isoladas e purificadas (8, 9, 10). Entre estas, alguns pesquisadores têm apontado a fito-hemaglutinina como um fator anti-nutricional e tóxico de grande importância (9, 11).

O presente trabalho visa obter frações proteicas do feijão através de métodos elementares de extração e estudá-las quanto ao seu valor nutritivo e digestibilidade, além de verificar "in vitro" a presença da fito-hemaglutinina.

MATERIAL E MÉTODOS

A) *Extração e Separação*

As sementes do feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*), variedade Goiano Precoce, foram moídas e extraídas com seis vezes o seu volume em uma solução de NaCl 1%, pH 8, tendo sido retirada a casca para facilidade técnica. A extração se fez por três vezes consecutivas, com forte agitação em um liquidificador. Ao extrato adicionou-se solução concentrada de HCl até pH 4. Deixou-se em repouso por 12 horas a 4°C e separou-se o precipitado por centrifugação. Guardou-se o sobrenadante. O precipitado, após lavagem com solução de HCl, pH

4, foi secado com corrente de ar quente, numa temperatura máxima de 60°C, por cerca de 20 horas. O produto obtido depois de pulverizado em moinho de bola, denominou-se FRAÇÃO INSOLÚVEL, em virtude de sua insolubilidade em solução de HCl durante sua obtenção.

O sobrenadante anterior e as soluções de lavagens foram autoclavadas a 127°C por 15 minutos, para precipitação das proteínas solúveis em solução de HCl, pH 4. O precipitado separado por centrifugação foi submetido ao mesmo procedimento anterior. O produto obtido denominou-se FRAÇÃO SOLÚVEL em virtude de sua solubilidade em solução de HCl durante sua obtenção.

Uma terceira fração, denominada FRAÇÃO TOTAL, foi obtida por adição de solução de HCl, até pH 4, ao extrato obtido acima, e aquecimento em autoclave, 127°C por 15 minutos e tratamento final idêntico aos anteriores.

O esquema número 1 resume as etapas de obtenção das frações proteicas do feijão.

B) Ensaios biológicos

Animais de experiências toram ratos albinos, machos da colônia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com 23 dias de nascidos, pesando entre 30 a 40 g. Grupos de seis ratos, colocados em gaiolas individuais receberam rações preparadas com as fontes proteicas abaixo especificadas:

1 - Feijão cru, descascado para facilidade técnica, pulverizado em moinho de bola (CRU).

2 - Feijão cru, moido, descascado para facilidade técnica, umedecido com solução de NaCl 1%, pH 8, secado em corrente de ar 60°C por volta de 20 horas e pulverizado em moinho de bola (CRU-60).

3 - Fração solúvel (FS)

4 - Fração insolúvel (FI)

5 - Fração insolúvel autoclavada a 127°C, 15 minutos, secado em corrente de ar 60°C cerca de 20 horas e moido em moinho de bola (FIA).

6 - Fração total (FT)

7 - Feijão cru integral deixado de molho por 30 minutos e autoclavado a 127°C, 15 minutos, secado em corrente de ar 60°C, passado em moinho de bola por 20 horas (COZIDO).

8 - Caseína (CAS).

As rações continham níveis equivalentes de proteínas a calorias além de sais minerais (12) e vitaminas (13). Algumas rações foram suplementadas com 0,20% de DL metionina (5). Também uma ração aprroteica foi preparada. A caseína era a fonte proteica de referência para o grupo controle. As rações preparadas incluíam óleo vegetal 7%, óleo de fígado de bacalhau 1%, mistura salina 5%, mistura de vitaminas (ml) 5% amido de milho em quantidade suficiente para 100%. Quantidade suficiente de amido foi substituída pelas fontes proteicas para dar um teor de proteínas ($N \times 6,25$) entre 9 e 10%.

O valor nutritivo foi medido através do PER (14) e a digestibilidade real (DR) de acordo com a fórmula:

$$DR = \frac{NI - (NF \cdot NM)}{NI} \times 100$$

onde:

NI = nitrogênio ingerido; NM = nitrogênio metabólico.

NF = nitrogênio fecal.

Estes parâmetros foram obtidos através de dosagens de nitrogênio, pelo método de Kjeldahl na dieta usada (nitrogênio ingerido) e nas fezes colhidas na terceira semana da experiência de valor nutritivo, quando os ratos tinham 37 dias de nascidos. Um grupo da mesma idade, em dieta aprroteica, forneceu fezes para determinação do nitrogênio metabólico.

C) Fatores Tóxicos

O estudo da fito-hemaglutinina se fez "in vitro" através de sua ação aglutinante de hemácias e de sua propriedade de crescer linfócitos em meio de cultura - ação blástica (15).

a) Ação blástica - Extração da fração ativa.

Agitaram-se as fontes proteicas nas quantidades correspondentes a 1,09% de proteínas com 20 ml de solução fisiológica por 12 horas. Fez-se a separação do resíduo por centrifugação e o sobrenadante diluído 10 vezes com solução fisiológica foi esterilizado por filtração, congelado e guardado até o momento de uso.

O preparo do meio de cultura e a técnica de cultivo dos linfócitos, assim como a preparação das lâminas e observações, seguiram as recomendações de Ferrari (16). As células estimuladas apresentavam um núcleo bem pronunciado, corado à violeta, ocasionalmente bizarros, com nucléolos proeminentes. O citoplasma é amplo com basofilia acentuada e às vezes

se mostra emitindo pseudópodos. Foram contadas um total de 500 células, procurando um maior número de campos microscópicos possíveis, estabelecendo-se a percentagem de células estimuladas. Consideramos baixa atividade blástica aquela que mostrou uma percentagem inferior a 30% e alta uma superior a 60%.

b) Ação aglutinante

Para o teste de aglutinação foram usadas hemácias humanas de um "pool" de tipos sanguíneos. As hemácias separadas por sedimentação, foram lavadas por três vezes com solução fisiológica. Os extratos das frações ativas foram descongelados e logo a seguir uma gota misturada com outra de hemácias e homogeneizadas. Observou-se a aglutinação macroscópica e microscópicamente. Considerou-se resultado positivo quando houve aglutinação.

D) Análise estatística

Análise de variancia foi aplicada aos resultados obtidos para comparação das médias. Estas foram analisadas pelos testes F e de Tukey. A homogeneidade da variação das medidas foi analisada pelo teste de Cochran (17).

RESULTADOS

A) Extração e Separação

A separação das proteínas de acordo com o esquema número 1, resultou na obtenção de três frações com características físico-químicas diferentes. A tabela I mostra o resultado dos teores proteicos e do rendimento destas frações. Estes valores são média de três determinações de nitrogênio feitas em duplicata para cada amostra.

B) Estudo "in vitro" e "in vivo"

O gráfico I mostra o resultado da variação média de peso de grupos de seis ratos e o consumo médio de ração pelos grupos no período da experiência. O ganho de peso médio do grupo controle, alimentado com caseína, do grupo de feijão cozido suplementado com DL metionina 0,20% foram iguais entre si e ambos superiores a todos os outros ($P < 0,01$).

O feijão cozido sem suplementação, apresentou um ganho de peso estatisticamente inferior as três frações suplementa-

das a um nível de significancia de 1% exceto para a fração total que foi de 5%. A fração insolúvel foi autoclavada para eliminação das substâncias tóxicas termo-lábeis, já que esta era a única fração que não sofreu tratamento térmico. Esta fração não autoclavada, assim como as do feijão CRU e CRU-60, mesmo suplementadas, apresentaram perda de peso como aconteceu com todas as frações não suplementadas.

O gráfico II mostra os resultados do PER e do índice de digestibilidade para as dietas que apresentaram ganho de peso. O grupo controle apresentou um valor de PER superior a todos os outros, a um nível de significância de 1%, exceto para o feijão cozido suplementado, cujo nível foi de 5%. Este, por sua vez, só diferiu do feijão cozido não suplementado e da fração total ao nível de 1% e 5%, respectivamente. Para este índice as três frações foram iguais entre si e superiores ao feijão cozido não suplementado ($P < 0,01$).

A suplementação não alterou o índice de digestibilidade do feijão cozido e se apresentou estatisticamente inferior aos demais ($P < 0,01$). A fração solúvel foi significativamente inferior à caseína ($P < 0,05$) e superior às duas outras ($P < 0,01$).

A Tabela II mostra os dados das experiências "in vitro" e "in vivo". As médias estatisticamente iguais se acham assinaladas pela mesma letra. A ação blástica foi alta para o feijão CRU, CRU-60 e fração insolúvel com valores respectivos de 75%, 78% e 70% de células estimuladas. Todas as outras tiveram valores baixos sendo de 10% para a fração solúvel, 24% para a fração insolúvel autoclavada e 30% para a fração total. A ação aglutinante só foi apresentada pelo feijão CRU e CRU-60.

DISCUSSÃO

Sabe-se que a solução diluída de NaCl é um dos melhores dispersantes de proteínas vegetais. Pusztai (18) usou esta solução para extrair proteínas do feijão recomendando uma faixa de pH entre 7 e 9. Com a aplicação destas recomendações tivemos uma extração por volta de 90% das proteínas.

Honavar e col. (11) utilizaram a solução concentrada de HCl para precipitar proteínas verificando-se que a fração sobrenadante era capaz de provocar morte em ratos. No presente trabalho, observamos que as três frações obtidas causavam a morte dos animais. A ação mais drástica foi verificada pela

fração insolúvel. Como esta não sofria ação do calor durante sua preparação, pode-se sugerir que a causa da toxicidade seja a presença de fatores tóxicos termonábeis, já descritos por Liener (6) e Jaffé e col. (19). O aquecimento desta fração levou a uma queda da taxa de mortalidade (Tabela II).

Bressani e col. (5) mostraram que o cozimento elimina fatores tóxicos e anti-nutricionais do feijão cru. Com o cozimento do feijão verificamos que os ratos não morreram. No entanto, parece ter sido parcial a destruição de alguns fatores tóxicos e anti-nutricionais das frações. Corroboramos este fato a detecção "in vitro" do fator responsável pelo crescimento de linfócitos como descreve Nowell (20) e Tanaka e col. (21). A destruição parcial provavelmente se deve a maior concentração de proteínas nas frações ou talvez a menor probabilidade de inativação das proteínas tóxicas por reações com outras substâncias que possam existir no grão integral.

Stead e col. (9) mostram que a fração tóxica intra-peritoneal difere cromatograficamente da fração aglutinante. Nós observamos de um lado, uma alta mortalidade para a fração insolúvel, praticamente igual a do feijão CRU ou CRU-60, de outro lado, uma alta ação blástica desta fração, que se mostrou diminuída com o aquecimento passando a um índice de mortalidade semelhante as outras frações. Os dois fatos observados permitem sugerir, por esta evidencia indireta, que a fração tóxica é a mesma da ação blástica ou está associada a ela.

Souza e col. (22) trabalhando em condições idênticas às nossas encontraram um valor de PER próximo ao nosso para feijão cozido. Kakade e col. (23) e Bressani e col. (5) mostraram que a suplementação com DL metionina melhora substancialmente o valor nutritivo do feijão. Nossos resultados estão de acordo com a literatura científica e mostram que as frações isoladas são também deficientes em metionina, pois a suplementação melhorou substancialmente o PER, igualando-o ao do feijão cozido suplementado. No entanto, o ganho de peso foi menor para os animais alimentados com as frações o que poderia ser atribuído à presença de fatores tóxicos que inibem o crescimento, fato já mencionado por Honavar e col. (11) e Jaffé e col. (19).

Na revisão sobre fatores tóxicos de legumes, Liener (6) apresenta a opinião de Jaffé de que a fito-hemaglutinina com-

bina com as células da parede intestinal interferindo com a absorção de nutrientes. Esta opinião está de acordo com nosso resultado para o ganho de peso dos animais, mas difere para a digestibilidade das frações proteicas. Neste caso, a absorção das frações proteicas está próxima daquela da caseína, todas significativamente melhores que a do feijão cozido. Como apontam Stead e col. (9) a fito-hemaglutinina não é uma proteína pura e é possível que a fração que impede a absorção não esteja presente nos produtos obtidos. Além disso, há outros fatores inibidores do crescimento no feijão que não foram examinados no presente trabalho e que podem estar influenciando no baixo ganho de peso dos animais. Deve ter em mente, ainda, que a suplementação com DL metionina possa ter possibilitado ao segundo amino-ácido limitante impedir o crescimento dos animais, somando-se portando este efeito ao dos tóxicos presentes.

De qualquer modo, o fato de uma melhoria na digestibilidade e na inalterabilidade do valor nutritivo, recomenda estudos tecnológicos sobre concentrados ou isolados de proteínas do feijão para consumo humano.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Dra. Iris Ferrari pela ajuda na verificação da presença do fator estimulante do crescimento de linfócitos e à Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo pelo fornecimento do feijão.

SUMMARY

Nutritive value of protein fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*

Beans proteins were extracted in a NaCl 1% solution, pH 8. The treatment of this extract with a HCl solution and heat to reach pH 4 gives rise to 3 protein fractions with different physico-chemical characteristics. Their protein content varied from 59.13 to 66.49%. The yield of one fraction (65%) was twice greater than of the other two.

Rat studies of the 3 isolated bean fractions showed a lower nutritive value than that of the cooked bean, when all diets were supplemented with DL methionine. On the other hand the digestibility of the fractions were better than that of the cooked bean. It was found that the DL methionine supplementation does not influence the digestibility of the diets.

Phytohemagglutinin in the isolated fractions and in the cooked beans were studied. It was not present. Blastocyst activities were found in the isolated beans fractions, although having a lower activity than that of raw bean.

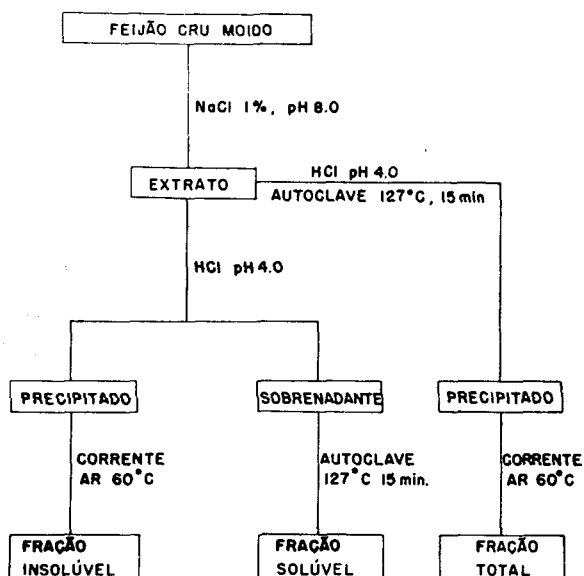
TABELA I - TEOR PROTEICO DAS FRAÇÕES ISOLADAS

FRAÇÃO	PROTEINA %	RENDIMENTO %
SOLÚVEL	59.13	32.50
TOTAL	64.24	65.00
INSOLÚVEL	66.49	32.50

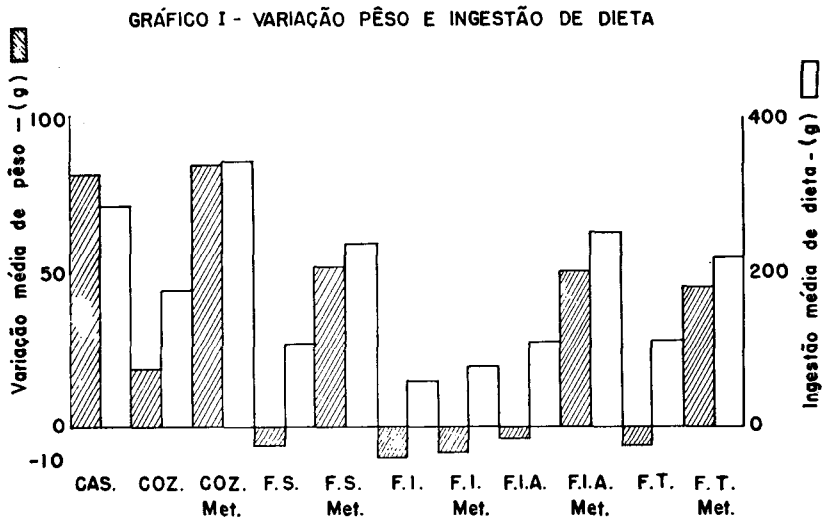
As frações proteicas mostradas na primeira coluna foram obtidas do feijão comum de acordo com o esquema Nº 1 (Vide descrição no texto).

ESQUEMA I

FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DO FEIJÃO



Representação esquemática do processo seguido para extração e obtenção três frações proteicas do feijão comum. A fração proteica insolúvel foi obtida por precipitação com HCl enquanto a solúvel por aquecimento em autoclave. A fração total obtida por ação simultânea de HCl e aquecimento (Vide texto).





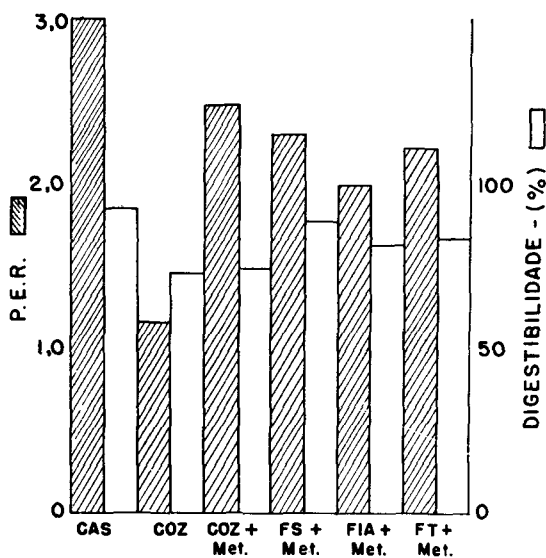
Representação da variação média do peso  e da ingestão média de dieta  por ratos alimentados com dietas contendo: caseína (CAS), feijão cozido (COZ) feijão cozido suplementado com 0,20% de DL metionina (COZ Met), fração solúvel (FS), fração solúvel suplementada com 0,20% de DL metionina (FS Met), fração insolúvel (FI) fração insolúvel suplementada com 0,20% de DL metionina (FI Met) fração insolúvel autoclavada (FIA), fração insolúvel autoclavada suplementada com 0,20% de DL metionina (FIA Met), fração total (FT) e fração total suplementada com 0,20% de DL metionina (FT Met).

GRÁFICO II - P.E.R. E DIGESTIBILIDADE





Representação do P. E. R.  e da digestibilidade  de dietas à base de caseína (CAS), feijão cozido (COZ), feijão cozido suplementado com 0,20% de DL metionina (COZ + Met), fração solúvel suplementada com 0,20% de DL metionina (FS + Met), fração insolúvel autoclavada suplementada com 0,20% de DL metionina (FIA + Met) e fração total suplementada com 0,20% de DL metionina (FT + Met).

TABELA II
ESTUDOS "IN VITRO" E "IN VIVO" DAS FONTES PROTÉICAS

FORTE	GANHO DE PÊSO ¹ g	C U P	DIGEST. REAL %	AÇÃO BLÁSTICA %	AÇÃO AGLUTI.
Caseína	82,0 [±] 10,82 y	3,00 [±] 0,08 h	92,53 [±] 1,48 a	-----	-----
Cozido ²	19,2 [±] 4,97 z	1,16 [±] 0,17 i	73,05 [±] 1,57 b	0	Neg.
Coz+Met.	85,0 [±] 12,83 y	2,48 [±] 0,23 m	74,45 [±] 1,95 b	-----	-----
Cru	-10,17	100% ³	-----	Alta	Pos.
Cru+Met.	-8,33	100% ³	-----	-----	-----
Cru-60	-10,50	100% ³	-----	Alta	Pos.
Cru-60+Met.	-9,00	100% ³	-----	-----	-----
F.S.	-6,17	50% ³	-----	Baixa	Neg.
F.S.+Met.	52,2 [±] 10,34 s	2,30 [±] 0,31 jm	88,74 [±] 3,13 c	-----	-----
F.I.	-10,00	83% ³	-----	Alta	Neg.
F.I.+Met.	-7,17	50% ³	-----	-----	-----
F.I.A.	-4,00	17% ³	-----	Baixa	Neg.
F.I.A.+Met.	50,50 [±] 18,18 s	1,99 [±] 0,37 j	81,62 [±] 2,13 d	-----	-----
F.T.	-6,00	33% ³	-----	Baixa	Neg.
F.T.+Met.	45,30 [±] 16,20 s	2,21 [±] 0,28 jm	83,47 [±] 1,66 d	-----	-----

Dentro de uma mesma coluna, letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias.

1 — Média de seis ratos.

2 — Média de cinco ratos.

3 — Percentagem de mortes dentro do grupo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Belden, Jr., G. C., Congleton, W. L., Devoto, W. R., Hurlburt, Jr., T. A. Johnston, B., Katz, D. P., Michelson, J. T., Pipkin, A. P., Tibbits, C. D., and Weston, D. R.: A special report on the protein-paradox malnutrition, protein-rich foods, and the role of business. The problem and the challenge. p. 1 (MR Management Reports Boston, Massachusetts 1964).
- 2.—Altschul, A. M.: Food protein for humans. *Chem Engin. News* 24: 68 (1969).
- 3.—Smith, A. K.: Vegetable protein isolates, in *Processed plant protein foodstuffs*. A. M. Altschul, Ed. p. 249. (Academic Press Inc., Publishers, New York, 1958).
- 4.—Meyer, E. W.: Soy protein concentrates and isolates. *Proceedings of International Conference on Soybean Protein Foods*. (United States Department of Agriculture Peoria, III. 1966).
- 5.—Bressani, R., Elias, L. G. and Valiente, A. T.: Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Brit. J. Nutr.* 17: 69 (1963).
- 6.—Liener, I. E.: Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Amer. J. Clin. Nutr.* 11: 281 (1962).
- 7.—Tedeschi, G. G., Petrelli, F. and Amici, D.: Toxicity of a protein fraction extracted from *Phaseolus vulgaris*. *Giorg. Biochim.* 14: 238 (1965) *Chem Abstr.* 63: 10560h (1965).
- 8.—Rigas, D. A. and Osgood, E. E.: Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 212, 607 (1955).
- 9.—Stead, R. H., De Muelenaere, H. J. H., and Quicke, G. V.: Trypsin inhibition, hemagglutination, and intraperitoneal toxicity in extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*. *Arch. Biochem. Biophys.* 113: 703 (1966).
- 10.—Jaffé, W. G. and Hannig, K.: Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophys.* 109: 80 (1965).
- 11.—Honavar, P. M., Cheang-Ven, S. and Liener, I. E.: Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutr.* 77: 109 (1962).
- 12.—Horwitz, W., Ed.: Official methods of analysis of the association of the official agricultural chemists. 10th ed. p. 785. (Washington 1965).
- 13.—Manna, L., and Hauge, S. M.: A possible relationship of vitamin B₁₃ to orotic acid. *J. Biol. Chem.* 202: 91 (1953).
- 14.—Chapman, P. G., Castillo, R. and Campbell, J. A.: Evaluation of protein in foods. A Method for the determination of protein efficiency ratio. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 679 (1959).
- 15.—Borjeson, J., Bouveng, R., Gardell, S., Norden, A. and Thunell, S. Purification of the mitosis-stimulating factor from *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Acta* 82: 158 (1964).
- 16.—Ferrari, I.: Estudos de alterações cromossômicas em pacientes portadores de anormalidade físicas múltiplas e retardo mental. Tese. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, U. S. P. Ribeirão Preto, S. P.
- 17.—Dixon, W. J. and Massey, Jr., F. J.: Introduction to statistical analysis (McGraw-Hill Book Company, Inc. New York 1951).

- 18.—Pusztai, A.: Studies on the extraction of nitrogenous and phosphorus-containing materials from the seeds of the kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem. J.* 94: 611 (1965).
- 19.—Jaffé, W. G. and Lette, C. V. L.: Heat-labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.* 94: 203 (1968).
- 20.—Nowell, P. C.: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20: 462 (1960).
- 21.—Tanaka, Y., Epstein, L. B., Brecher, G. and Stohlman, Jr., F.: Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood. *Blood* 22: 614 (1963).
- 22.—Souza, N. e Dutra de Oliveira, J. E.: Estudo experimental sobre o valor nutritivo de misturas de arroz e feijão. *Rev. Bras. de Pesquisas Med. Biol.* 2: 175, (1969).
- 23.—Kakade, M. L. and Evans, R. J.: Effect of methionine, vitamin B₁₂ and antibiotics supplementation on protein nutritive value of navy beans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 890 (1964).