

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ASPECTOS NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS DO FEIJÃO CARIOCA 80 (*Phaseolus vulgaris* L.)

Admar Costa de Oliveira,¹ Haiko Enok Sawazaki² e
Maria Antonia Martins Galeazzi³

Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola
Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, e
Instituto Agrônômico de Campinas, São Paulo, Brasil

RESUMO

A extração, fracionamento e caracterização electroforética em gel de poliacrilamida simples e contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) das proteínas de feijão Carioca 80 (*Phaseolus vulgaris*) foram realizadas em três valores de pH (2.5, 7.0 e 9.0). A extração feita em pH 7.0 mostrou ser mais eficiente e proporcionou uma melhor separação das frações albumina e globulina após diálise. Nas frações globulina, as mobilidades relativas das principais proteínas ocorreram entre 0.30 e 0.40, sendo observada uma dissociação com o aumento de pH. Os pesos moleculares das duas bandas mais representativas foram 35,400 e 76,900 e, com relação ao inibidor de tripsina, três bandas com 28,800, 22,500 e 18,300. A digestibilidade pela pepsina e pancreatina *in vitro* forneceu valores de 33.43% e 62.63% para a farinha integral e para a proteína precipitada em pH 4.5, respectivamente. O teor de metionina disponível de 1.36 g/16 g N encontrado, aparece como elevado com relação a outras variedades de feijão.

INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos relativos a proteína de feijão têm sido direcionados para o aumento da concentração e melhoria da qualidade protéi-

Manuscrito modificado recebido: 24-3-87.

- 1 Engenheiro Industrial Químico, atualmente realizando Doutorado no Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121 - 13. 100 - Campinas, São Paulo, Brasil (a/c Maria Antonia Martins Galeazzi).
- 2 Pesquisador, Seção de Fitoquímica, Instituto Agrônômico, Campinas, São Paulo, Brasil.
- 3 Professor Adjunto, Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.

ca. Em relação a concentração de metionina, principal aminoácido limitante, foi encontrado que seu aumento em cotilédones de feijão, não obstante o fato de depender da concentração protéica total, está diretamente relacionado com o teor das frações albumina e a solúvel em álcali do resíduo de extração (1, 2). O estudo e desenvolvimento de composição geneticamente controlada das proteínas tornou-se necessário no esforço para aumentar o valor nutricional das sementes de leguminosas. No presente trabalho, procurou-se determinar a extratibilidade e características electroforéticas das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade Carioca 80, obtidas em diferentes valores de pH, bem como as respectivas atividades de inibidor de tripsina, a digestibilidade pela pepsina e pancreatina *in vitro* e os teores de metionina disponível da farinha integral e do resíduo obtido pela precipitação a pH 4.5.

MATERIAL E METODOS

Utilizou-se feijão (*Phaseolus vulgaris*, L) da variedade Carioca 80, safra de águas de 1981, proveniente da seção de leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo.

Extração e Fracionamento das Proteínas

O feijão em grão foi moído até obtenção de farinha com granulometria de 50 malhas (ABNT)⁴. Foram realizadas três extrações a partir de 25 g de farinha a diferentes valores de pH, respectivamente 2.5, 7.0 e 9.0. O procedimento utilizado seguiu basicamente o esquema simplificado da extração e fracionamento das proteínas apresentado na Figura 1.

Os conteúdos de nitrogênio e proteína bruta (N x 6.25) foram determinados na farinha, frações S1 e frações R1 por método semi-micro Kjeldahl, modificado por Gunning e Arnold em 1892, utilizando-se ainda selênio como catalisador na digestão, conforme proposição de Lauro, em 1931 (3). Os teores de proteína das frações S1, S2 e S3 foram determinados pelo método do biureto, segundo Weichselbaum (4) e o de Lowry *et al* (5), sendo os resultados transformados para o método de Kjeldahl.

Determinação da Atividade do Inibidor de Tripsina

A atividade do inibidor de tripsina foi determinado na farinha integral, frações S1, S2 e S3. O procedimento utilizado foi basicamente o de Kunitz (6), com modificações introduzidas por Kakade, Simons e Liener (7). A tripsina e caseína utilizadas foram procedentes da Sigma Chemical Co.

Electroforese em Gel Simples de Poliacrilamida

As frações, após congeladas e liofilizadas foram submetidas à electroforese em gel simples de poliacrilamida, segundo o método de Davis (8).

⁴ Associação Brasileira de Normas Técnicas.

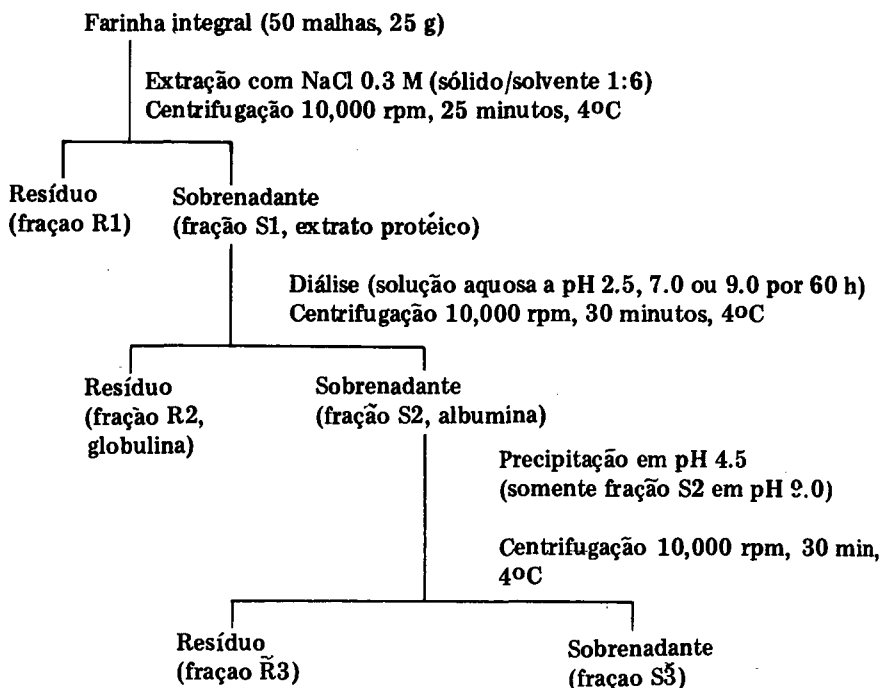


FIGURA 1

Extração e fracionamento das proteínas de feijão Carioca 80

Electroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

Realizada segundo o método de Weber e Osborn (9), nas frações S2 e R2 extraídas a pH 7.0; S2 e R3 extraídas a pH 9.0. Para a elaboração da curva padrão e determinação dos pesos moleculares utilizou-se como padrões albumina de soro bovino (P. M. 65,000; Merk), desidrogenase láctica (P. M. 36,000; Sigma), lisozima (P. M. 14,100; Sigma) e pepsina (P. M. 35,000; Sigma).

Digestibilidade in vitro pela Pepsina e Pancreatina

A farinha integral e a fração R3 foram submetidas à digestão enzimática pela pepsina e pancreatina segundo o procedimento descrito por Akeson e Stahmann (10), determinando-se os nitrogênios digeridos. A digestibilidade é a porcentagem do nitrogênio da amostra que foi digerida pelo sistema enzimático utilizado, corrigido pelo nitrogênio produzido pela autodigestão do sistema enzimático. A digestibilidade corrigida considera o nitrogênio originalmente solúvel da amostra.

$$\frac{\text{o/o Digestibilidade corrigida}}{=} = \frac{\text{Nd} - \text{Nb} - \text{Ns}}{\text{Nt} - \text{Ns}} \times 100$$

Nt = mg N total amostra.

Nd = mg N digerido

Nb = mg N produzido pela autodigestão do sistema enzimático

Ns = mg N originalmente solúvel da amostra

Determinação de Metionina Disponível

Determinado nos hidrolisados da farinha integral e fração R3 obtidas pela ação da pepsina e pancreatina, pelo método baseado no desenvolvimento de coloração com nitroprussiato de sódio de McCarthy e Sullivan, 1941, modificado por Tannenbaum, Barth e Le Roux (11). Somente a histidina e o triptofano têm interferência positiva. É um método seletivo para a metionina, distinguindo-a da sulfona ou sulfóxido, pois a reação se processa apenas com os grupos metionil não alterados. De acordo com a marcha analítica, em um balão volumétrico de 5 ml foram colocados 0.5 ml NaOH 5N, 0.8 ml de nitroprussiato de sódio 1% e 1.0 ml de HCl 8N com agitação. Após adição de 1 a 2 ml de amostra hidrolisada (0.1 a 1.0 mg metionina), completou-se o volume, agitou-se por 1 minuto e realizou-se a leitura dentro de 5 minutos a 510 nm (a leitura rápida elimina a interferência de triptofano).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extratibilidade e Fracionamento das Proteínas em Função do pH

Na Tabela 1, estão dispostos os resultados encontrados para a extração de proteínas nos respectivos valores de pH. De maneira geral, pode-se dizer que, nas condições do experimento, as extrações foram baixas (média de 80%), sendo o melhor resultado obtido em pH 7.0, com 64.95% de extração. Através de um exame da Tabela 2 onde apresenta-se o balanço da quantidade de proteína durante os processos de extração, com as respectivas percentagens de perda, verificase que estas foram pequenas para os três casos, o que ratifica o fato de que as extrações não foram eficientes. A utilização de métodos distintos na determinação dos teores protéicos das frações S1, forneceu valores diferentes, que levaram a percentagens de extração diversas daquela obtida com o método de Kjeldahl. Tanto o método do biureto como o de Lowry forneceram valores de extração protéica superiores àqueles obtido pelo método de Kjeldahl (Tabela 3). Por outro lado, foi encontrada correlação linear entre o quociente dos teores de proteína determinados pelos métodos de Kjeldahl e do biureto com o pH de extração, definida pela reta, quociente Kjeldahl/Biureto = 0.9185 - 0.0176 pH, com um coeficiente de regressão $r^2 = 0.9530$. O quociente entre os teores protéicos obtidos pelos métodos de Kjeldahl e de Lowry, praticamente independe do pH de extração, mas apresenta valores ainda menores. Tendo em vista os resultados acima discutidos, alerta-se para a necessidade de utilização de um mesmo método de determinação de proteína durante o acompanha-

TABELA 1

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FEIJÃO CARIOCA 80 EM DIFERENTES VALORES DE pH

Material	Proteína bruta g	Extração o/o
Farinha integral	5.24	
Fração S1 (pH 2.5)	2.70	51.58
Fração S1 (pH 7.0)	3.40	64.95
Fração S1 (pH 9.0)	3.23	61.70

TABELA 2

BALANÇO DE PROTEÍNA E PERCENTAGEM DE PERDA NA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FEIJÃO CARIOCA 80 EM DIFERENTES VALORES DE pH

Material	Proteína bruta (g)		
	pH 2.5	pH 7.0	pH 9.0
Farinha integral	5.24	5.24	5.24
Fração S1	2.70	3.40	3.23
Fração R1	2.47	1.71	1.91
Perda	0.06	0.12	0.10
o/o Perda	1.21	2.36	1.87

mento do processo de extração. A Tabela 4 mostra os teores de proteína transformados pelo quociente Kjeldahl/Biureto, obtidos nas frações S2 e S3. A comparação dos resultados obtidos indica que, apesar da maior extratibilidade a pH 7.0, o teor protéico da fração S2 foi menor, sugerindo ocorrer a melhor separação das frações R2 e S2 neste mesmo valor de pH.

Atividade do Inibidor de Tripsina

As atividades específicas do inibidor de tripsina, expressas em termos de unidades de tripsina inibidas (UTI) por mg de proteína, da farinha integral e das frações S1, S2 e S3, estão dispostas na Tabela 5. A maior atividade específica, encontrada na fração S1 em pH 2.5, pode ser atribuída a maior purificação do inibidor e a menor extração da proteína neste valor de pH (Tabela 1). Por outro lado, o fato da fração S2 em pH 7.0 ter apresentado o maior valor de atividade entre as frações S2 reflete a melhor separação das frações S2 e R2 neste valor de pH, sabendo-se que a fração S2 (albumina) é a maior responsável pelo efeito inibidor, pois a fração R2 (globulina) possui muito pouca atividade anti-trípptica (12). O aumento da atividade da fração S3 em relação à S2 a pH 9.0

TABELA 3

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DE FEIJÃO CARIOCA 80 EM DIFERENTES VALORES DE pH, PELA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES METODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA NOS EXTRATOS PROTÉICOS

Material	Proteína bruta g			Extração o/o			Quociente	
	Kjeldahl	Biureto	Lowry	Kjeldahl	Biureto	Lowry	Kjeldahl/ Biureto	Kjeldahl/ Lowry
Farinha integral	5.24							
Fração S1 (pH 2.5)	2.70	3.12	3.78	51.58	59.60	72.21	0.87	0.71
Fração S1 (pH 7.0)	3.40	4.21	4.82	64.95	80.44	92.15	0.81	0.70
Fração S1 (pH 9.0)	3.23	4.29	4.69	61.70	81.94	89.57	0.75	0.69

TABELA 4

CONTEÚDO DE PROTEÍNA BRUTA DAS FRAÇÕES S2 E S3 OBTIDAS DE FEIJÃO CARIOCA 80, EM DIFERENTES VALORES DE pH DE EXTRAÇÃO

Material	Proteína bruta g	Proteína do sobrenadante o/o
Fração S2 (pH 2.5)	1.12	0.95
Fração S2 (pH 7.0)	0.84	0.70
Fração S2 (pH 9.0)	1.32	1.06
Fração S3 (pH 4.5)	0.25	0.51

TABELA 5

ATIVIDADES ESPECÍFICAS DO INIBIDOR DE TRIPSINA DA FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO CARIOCA 80 E DAS FRAÇÕES S1, S2 E S3 NOS DIFERENTES pHs DE EXTRAÇÃO

pH	Atividade específica do inibidor de tripsina (UTI/mg)			
	Material			
	Farinha integral	Fração S1	Fração S2	Fração S3
—	133.72	—	—	—
2.5	—	114.84	110.93	—
7.0	—	92.24	248.90	—
9.0	—	93.83	170.45	—
4.5	—	—	—	204.65

pode ser atribuída ao baixo teor protéico solúvel ou ao fato de que o ponto isoelétrico do inibidor de tripsina em feijão Carioca 80 provavelmente ocorre em valor de pH diferente de 4.5.

Caracterização Eletroforética das Frações Protéicas

Eletroforese em gel de poliacrilamida simples. — A Figura 2 mostra os perfís eletroforéticos, em gel de poliacrilamida simples, das frações S2 e R2 nos três valores de pH, assim como das frações S3 e R3. As frações mostraram variação em R_m de 0.15 a 1.00. As de mais alta concentração forneceram mobilidades relativas médias de 0.40 e 0.30. A melhor separação dessas frações protéicas verificou-se a pH 7.0, onde a banda de R_m 0.40 apresenta baixa intensidade na fração albumina (S2) e forte na globulina (R2), sugerindo que esta banda pertença às globulinas. As globulinas são constituídas por duas frações protéicas, a solúvel e a insolúvel a pH 4.7 (13), ou respectivamente, G1 e G2, sendo reportado que a

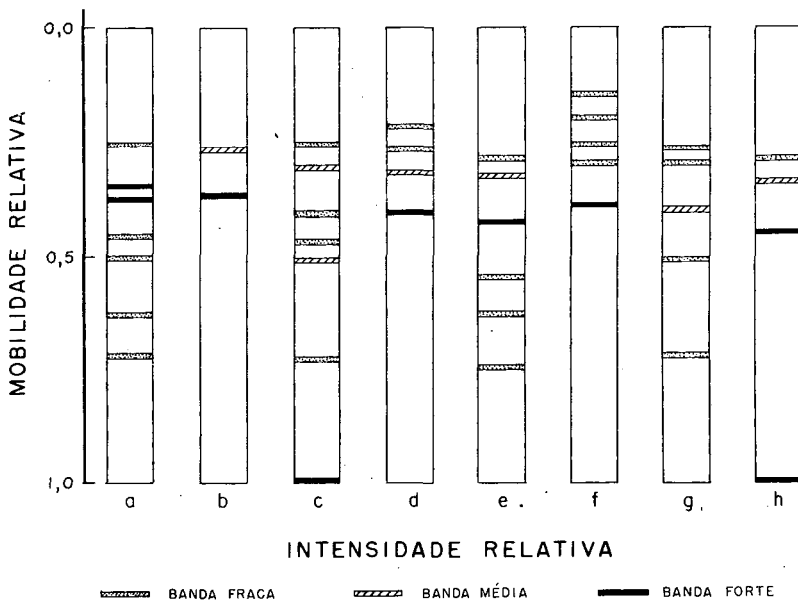


FIGURA 2

Perfil eletroforético, em gel simples de poliacrilamida, das frações protéicas de feijão Carioca 80, obtidas por extração em diferentes valores de pH: a = fração S2 (pH 2.5); b = fração R2 (pH 2.5); c = fração S2 (pH 7.0); d = fração R2 (pH 7.0); e = fração S2 (pH 9.0); f = fração R2 (pH 9.0); g = fração S3 (pH 4.5); h = fração R3 (pH 4.5)

fração G1 se dissocia com o pH (14). A análise dos resultados mostra que de fato existe dois componentes na fração R2 correspondente à globulina e constata o aumento do número de bandas do pH 2.5 ao 9.0, provavelmente decorrente da dissociação da fração G1. O exame dos perfis eletroforéticos mostra que as frações R2 (globulinas), representativas de cerca de dois terços das proteínas do feijão (15), foram isoladas nos três valores de pHs; porém, as frações S2 (albuminas) apresentaram bandas protéicas com mobilidades eletroforéticas coincidentes as das frações R2 (globulinas), indicando não terem sido isoladas. As frações S2 para os três valores de pH, apresentaram três a quatro bandas semelhantes representando provavelmente as albuminas, incluindo o inibidor de tripsina com Rm igual a 0.51, 0.63 e 0.73 (12,15). A banda com Rm igual a 1.0 encontrada na fração S2 a pH 7.0 e na fração R3, parece ser devida a um tipo de associação do inibidor de tripsina, que tende a se desfazer em função do tempo decorrido após o preparo da amostra (16). Em relação à proteína precipitada no ponto isoelétrico (pH 4.5), pode ser observado que a fração R3 apresenta as bandas de globulina com intensidade maior do que na fração S3, indicando ter precipitado grande parte da fração protéica, semelhante ao verificado por Sgarbieri (15) que encontrou uma precipitação de 70% ó

das proteínas de feijão em pH ao redor de 4.0. Outra observação a ser feita é a de que o inibidor permaneceu na fração S3 e na R3, após a precipitação, ratificando o aspecto com relação à atividade do inibidor de tripsina já reportado.

Eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo SDS. — A Figura 3 mostra os perfis eletroforéticos, em gel de poli(acrilamida) contendo SDS, das frações S2 e R2 em pH 7.0, S2 em pH 9.0 e R3 em pH 4.5. As mobilidades relativas das proteínas variaram entre 0.017 a 0.676, correspondendo a pesos moleculares de 99,400 a 18,000, obtidos através da curva padrão log. P.M. = $5.0165 - 1.1249 R_m$, com um coeficiente de regressão $r^2 = 0.9944$. As bandas mais representativas apareceram com R_m s 0.12 e 0.42, respectivamente, com pesos moleculares de 76,900 e 35,450. Pode ser observada a influência do pH 9.0 na dissociação das subunidades da fração R2. O inibidor de tripsina aparece nas frações S2 e S3 com suas três bandas características, tendo sido determinadas mobilidades relativas médias iguais a 0.50, 0.59 e 0.67, correspondendo a pesos moleculares 28,800, 22,500 e 18,300, respectivamente.

Digestibilidade in vitro pela Pepsina e Pancreatina

Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 6. O valor de 33.43% para a digestibilidade corrigida (com relação ao branco da amostra) da farinha integral, apresenta-se intensamente baixo, devido à alta concentração de nitrogênio solúvel encontrada, de 26.32%, em relação ao nitrogênio total da amostra. O fato da digestibilidade da proteína precipitada no ponto isoelétrico (fração R3), ao apresentar um valor de digestibilidade superior ao da farinha integral, provavelmente indica a existência de interação entre a proteína da farinha com outros componentes do feijão, ocasionando uma perda de digestibilidade em relação à proteína isolada. As atividades do inibidor de tripsina nos digeridos e brancos das amostras, após a remoção com éter sulfúrico do ácido tricloroacético (TCA), utilizado para interromper a digestão, estão dispostas na Tabela 7, onde verifica-se ainda, embora fraca, atividade anti-trípica para todos materiais analisados. Fenômeno semelhante foi encontrado por Antunes (12), que verificou a presença de inibidores de proteases em sólidos dialisáveis (P.M. menor que 10,000) e atribuiu o fato à existência no feijão de inibidores de baixo peso molecular ou à fragmentação de inibidores com peso molecular mais elevado, originando fragmentos ativos dialisáveis. A atividade do inibidor de tripsina obtida após a digestão enzimática *in vitro*, parece ter apresentado uma relação inversa com a digestibilidade da farinha integral e a da fração R3 (Tabelas 6 e 7).

Disponibilidade de Metionina

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos na determinação de metionina disponível. As concentrações utilizadas (c) e as respectivas absorbâncias (a) encontradas na construção da curva padrão de metionina, forneceram a equação $A = 0.0216 + 1.2166 c$ (mg/ml), com um coeficiente de regressão $r^2 = 0.9997$. Os resultados mostram que esta variedade de feijão possui um teor elevado de metionina disponível, qual seja de 1.36

TABELA 6

DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E PANCREATINA *in vitro* DA FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO CARIOCA 80 CRÚ E DA FRAÇÃO R3 DO PONTO ISOELÉTRICO (pH 4.5)

Amostra	Peso amostra mg	Nitrogênio da amostra mg	Nitrogênio do digerido mg	Digestibilidade o/o	Digestibilidade corrigida o/o
Farinha integral	1,000	33.5	20.0	50.95	33.43
Fração R3	300	37.1	27.9	67.34	62.63
Farinha integral (branco)	1,000	33.5	8.8		
Fração R3 (branco)	300	37.1	4.7		
Branco de enzima (autodigestão)	70	11.2	2.9		

TABELA 7

ATIVIDADE ESPECIFICA DE INIBIDOR DE TRIPSINA NOS DIGERIDOS DE FARINHA INTEGRAL E FRAÇÃO R3 DO PONTO ISOELÉTRICO DE FEIJÃO CARIOCA 80, APÓS HIDRÓLISE COM PEPSINA E PANCREATINA E PRICIPITAÇÃO COM TCA

Material digerido	Atividade específica UTI/mg
Farinha integral	10.74
Fração R3	9.70
Farinha integral (branco)	11.22
Fração R3 (branco)	6.90

TABELA 8

TEOR DE METIONINA DISPONIVEL EM FARINHA INTEGRAL E FRAÇÃO R3 DO PONTO ISOELETRICO DE FEJAO CARIOCA 80

Material	Metionina disponível g/16 g N
Farinha integral	1.36
Fração R3	1.77

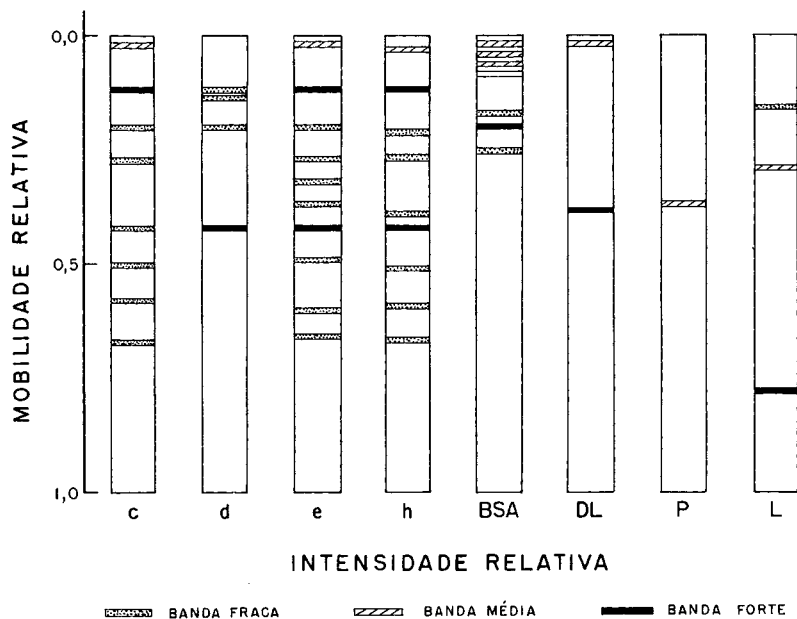


FIGURA 3

Perfil eletroforético em gel de poli-acrilamida contendo SDS das frações protéicas de feijão Carioca 80, obtidas por extração em diferentes valores de pH: c = fração S2 (pH 7.0); d = fração R2 (pH 7.0); e = fração S2 (pH 9.0); h = fração R3 (pH 4.5)

g/16 gN, na farinha integral e de 1.77 g/16 gN na fração R3, tendo em vista os estudos de Jaffé e Brücher (17), que verificaram ser de 1.12 g/16 gN o valor médio da metionina total para 100 linhagens puras de feijão. Experimentos com ratos em andamento neste laboratório têm mostrado valores biológicos de disponibilidade de metionina semelhantes (18). Por outro lado, a determinação do aminograma total da farinha integral em analisador de aminoácidos Beckman 119 CL, mostrou um teor de metionina igual a 1.00 mg/16 g N; este aspecto pode ser atribuído a perdas oxidativas de metionina durante o processo de análise (19).

SUMMARY

EXTRACTION, PARTIAL CHARACTERIZATION AND NUTRITIONAL ASPECTS OF PROTEINS FROM CARIOCA 80 BEANS (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Extraction, fractionation and characterization by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis of proteins from Carioca 80 beans (*Phaseolus vulgaris*) were performed at three pH values (2.5, 8.0 and 9.0). Extraction at pH 7.0 proved to be more efficient and, after dialysis, produced a better separation of the albumin and globulin fractions. Relative mobility of the main protein in the globulin

fractions occurred between 0.30 and 0.40, and dissociation was observed when the pH was increased. The two most representative bands gave molecular weights of 35,400 and 76,900, while in regard to the trypsin inhibitor, three bands gave 28,800, 22,500 and 18,300. Pepsin and pancreatin *in vitro* digestibility rendered values of 33.43% and 62.63% for whole flour and for protein precipitated at pH 4.5, respectively. The content of available methionine found, of 1.36 g/16 g N, appears to be high in relation to that of other bean varieties.

BIBLIOGRAFIA

1. Bliss, F.A. **Improving the Quality and Quantity of Bean Seed Protein**. Dept of Horticulture, Univ. of Wisconsin, Madison, 1978, 62 p.
2. Ma, Yu & F.A. Bliss. Seed proteins of common bean. **Crop Science**, 18:431, 1978.
3. Montes, A.L. Determinación de las proteínas y de otras sustancias nitrogenadas vinculadas en los alimentos. En: **Bromatología**. Tomo I. Ed. Universitaria de Buenos Aires, 1966, p. 9.
4. Weichselbaum, T.E. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amounts of blood serum and plasma. **Amer. J. Clin. Pathol. Tech. Suppl.**, 10:40, 1946.
5. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193:265, 1951.
6. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. **J. Gen. Physiol.**, 30: 291, 1947.
7. Kakade, M.L.; N. Simons & I.E. Liener. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chem.**, 46:518, 1969.
8. Davis, B.J. Disk electrophoresis, II. Method and application to human serum proteins. **Annals N.Y. Acad. Sci.**, 121:404, 1964.
9. Weber, K. & M. Osborn. The reliability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.**, 244: 4406, 1969.
10. Akeson, W.R. & M.A. Stahmann. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J. Nutr.**, 83:257, 1964.
11. Tannenbaum, S.M., H. Barth & J.P. Le Roux. Loss of methionine in casein during storage with autoxidizing methyl linoleate. **J. Agric. Food Chem.**, 17:1353, 1969.
12. Antunes, P.L. **Composição e Propriedades das Proteínas do Feijão Rosinha G₂ (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 1979, 166 p.
13. Danielsson, C.E. Seed globulins of the gramineae and leguminosae. **Biochem. J.**, 44:387, 1949.
14. Sun, S.M.R.; F.A.B. McLeester & T.C. Hall. Reversible and irreversible dissociation of globulin from *Phaseolus vulgaris* seeds. **J. Biol. Chem.**, 249:2118, 1974.
15. Sgarbieri, V.C. **Propriedades Físico-químicas e Nutricionais de Proteínas de Feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) variedade Rosinha G₂**. Tese (Livre Docência). Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 1979, 207 p.
16. Eldridge, A.C., J.E. Kalbrener & W.J. Wolf. Soybean trypsin inhibitor: A reference protein for gel electrophoretic studies of soybean proteins. **Cereal Chem.**, 47:167, 1970.

17. Jaffé, W.G. & O. Brücher. El contenido de nitrógeno total y aminoácidos azufrados en diferentes líneas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **24**:107, 1974.
18. Sgarbieri, V.C., S. Tezoto & A.C. Oliveira. Estudo da composição e do valor nutritivo de uma nova cultivar de feijão. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Em: **VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Brasília, Outubro 1983, p. 85.
19. Robel, E.J. & A.B. Crane. An accurate method for correcting unknown amino acid losses from protein hydrolyzates. *Analytical Biochemistry*, **48**:233, 1972.