

VALOR NUTRICIONAL DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.), CULTIVARES RICO 23, CARIOCA, PIRATÃ-1 E ROSINHA-G2

ANTUNES, Pedro L.; BILHALVA, Aldonir B.; ELIAS, Moacir C. & SOARES, Germano J.D.

UFPEL / FAEM - Dept^o. Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Campus Universitário - Caixa Postal, 354
CEP 96010 - 900 - Tel. (0532) 75 7258 - Pelotas/RS - Brasil.

(Recebido para publicação em 10/11/94)

RESUMO

O valor nutricional e os fatores anti-nutricionais foram estudados em 4 cultivares de feijão, com características físico-químicas similares, comumente encontradas no comércio brasileiro. A grande atividade dos fatores anti-nutricionais (antitripsina e lectina) dessas leguminosas, provocaram 100% de letalidade em ratos alimentados *ad libitum* com dieta contendo feijão cru. Os valores nutricionais e respectiva variação foram 0,75 - 1,32 para PER; 39,40 - 58,90% para o valor biológico e 50 - 69,5% para a digestibilidade. O feijão, cultivar Rico 23, apresentou os melhores resultados para o PER e valor biológico, seguido pelas cultivares Piratã-1, Rosinha-G2 e Carioca. A maior digestibilidade foi observada na cultivar Piratã-1. O cozimento dos feijões não melhorou a digestibilidade "in vivo" além de 69,50%.

Palavras-Chave: Leguminosas, Feijão, Antitripsina, Lectina, Valor Nutricional

ABSTRACT

Nutritional value and antinutritional factors were studied in beans of four cultivars, with similar physico-chemical characteristics, found in Brazilian's commerce. Those leguminous showed high activity of antinutritional factors - antitrypsin and lectin - and diet with raw bean killed 100% of experimental rats. The nutritional aspects and range values were: 0.75 to 1.32 for PER; 39.40 to 58.90% for biological value and 50 to 69.50% for digestibility. The best values for PER and biological value was to the bean cultivate Rico 23, ranked for Piratã-1, Rosinha-G2 and Carioca. The protein digestibility "in vitro" did not raise beyond 69.50% when the beans are cooked.

Key Words: Leguminous, Bean, Antitrypsin, Lectin, Nutritional Value

INTRODUÇÃO

O feijão comum constitui importante fonte proteica na dieta de enorme parcela da população mundial, em especial nos países onde o consumo de proteína animal é limitado, por razões econômicas ou religiosas e culturais. No Brasil é a principal leguminosa fornecedora

de proteínas, fazendo parte da dieta diária das classes sócio-econômicas menos favorecidas. Embora seu grande consumo, a contribuição nutricional dos feijões deixa muito a desejar, pois suas proteínas têm baixa digestibilidade e inadequado balanço de aminoácidos essenciais, bem como substâncias tóxicas e anti-nutricionais, especialmente quando cru ou mal processado. Muitos estudos têm procurado entender o significado desses agentes prejudiciais à qualidade nutricional dos feijões, resultando no isolamento de alguns deles, enquanto outros continuam desconhecidos.

O interesse no trabalho reside na importância que o feijão tem na dieta da população brasileira, visando fornecer subsídios sobre as características nutricionais das cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, é uma leguminosa originária, segundo Kaplan (1965), de regiões da antiga cultura incaica, apresentando um alto teor protéico na composição centesimal.

Apesar do conhecimento de que o feijão cru causava morte de animais de laboratório, somente em 1944, Bowman e/ou Ham e Sandstedt, detectaram a presença de anti-tripsina em feijão comum. Tal substância apresentava efeito retardatório sobre o crescimento de ratos, tornando-se inativa pelo tratamento térmico. Borchers *et alii* (1947), fizeram a primeira investigação sistemática sobre a anti-tripsina em leguminosas. Wagner e Riehm (1967), purificaram e caracterizam parcialmente o inibidor da tripsina em feijão comum, com 23.000 de peso molecular, sendo que a reação estequiométrica com a tripsina é instantânea e irreversível, formando um composto estável.

A presença de fito-hemaglutinina ou lectina em feijão comum foi detectada em 1908 por Landsteiner e Kaubitschek, que observaram o efeito aglutinante dessa substância sobre os glóbulos vermelhos do sangue de vários animais. Reforçando essas observações, Rigas & Osgood (1955), Jaffé & Gaede (1959), Hanovar *et alii* e Kakade & Evans (1965), mostraram um efeito inibitório do crescimento de ratos alimentados com dietas contendo proporções de lectinas de feijão comum. Jaffé (1968), sugeriu que a ação das lectinas deve ser a de

combinar-se com as células da parede intestinal e, assim, interferir com a absorção dos nutrientes.

Sharon & Liss (1972), bem como Liener (1966 e 1976), referiram que, embora as propriedades físico-químicas e biológicas da antitripsina e das lectinas sejam diferentes, essas substâncias mostram o efeito comum de diminuir o crescimento de animais jovens, influenciando a digestibilidade e a utilização metabólica dos nutrientes.

As proteínas do feijão comum foram objeto de muitas investigações, desde os estudos iniciais de Osborne em 1894, primeiro autor a relatar que eram globulinas a grande maioria das proteínas dessa leguminosa, fato comprovado, a seguir, por outros pesquisadores, segundo Jaffé & Hannig (1965).

Pant & Tulsiani (1969), estudando 19 de leguminosas silvestres, encontraram uma variação protéica de 18 a 47% entre as cultivares. Silva & Iachan (1975), realizaram estudos com 17 cultivares brasileiras de feijão, encontrando uma variação protéica entre 22 e 32%.

Embora rico em proteínas, Tandon *et alii* (1957), mostraram que a metionina é o aminoácido limitante, fato comprovado por outros pesquisadores como Bressani *et alii* (1961), Moraes & Angelucci (1971) e Baldi & Salamini (1973), que verificaram variações entre 0,7 e 1,56g/16gN, cujas médias são inferiores as preconizadas pelo padrão da FAO (1965).

Diversos estudos, Bressani *et alii* (1963), Pant & Tulsiani (1969) e Antunes & Markakis (1977), mostraram que ratos alimentados com dieta contendo feijão autoclavado apresentam pequeno crescimento, enquanto que a mesma dieta, quando suplementada com metionina resulta num desenvolvimento comparável com o da dieta contendo caseína como proteína padrão. A disponibilidade biológica da metionina é baixa segundo Evans *et alii* (1974) e Sgarbieri (1978), pois cerca de 49% da mesma é excretada nas fezes, como parte das proteínas não digeridas.

MATERIAL E MÉTODOS

O material foi feijão das cultivares Rico 23, Piratã-1, Rosinha-G2 e Carioca, fornecido pelo Instituto Agrônomo de Campinas, SP. Os animais utilizados nos ensaios biológicos foram ratos albinos, linhagem Wistar, com 21-25 dias de idade e 30-45g de peso corporal, alimentados com dieta contendo 10% de proteína, nas dietas controle (caseína) e nas amostras de feijão.

Umidade

A umidade das cultivares de feijão e das dietas correspondentes foi determinada pelo método do A.O.A.C. (1975).

Cinza

A cinza das cultivares de feijão foi determinada segundo o procedimento do A.O.A.C. (1975).

Extrato Etéreo

Esta determinação utilizou a extração da gordura das amostras de feijão pelo Soxhlet, segundo a A.O.A.C. (1975).

Proteína

A proteína das amostras de feijão e das dietas utilizadas foi realizada segundo o método de semi-microkjeldahl, descrito no AOAC (1975).

Fibra

A determinação de fibra bruta nas amostras de feijão foi realizada segundo o procedimento descrito no AOAC (1975).

Nitrogênio Não-Protéico

Esta determinação foi realizada segundo Becker *et alii* (1940). A precipitação das proteínas utilizou ácido tricloroacético a 10% e a avaliação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl.

Aminoácidos Totais

A determinação dos aminoácidos das proteínas de feijão utilizou a separação dos aminoácidos por troca iônica, conforme procedimento de Spackman *et alii* (1958) e usando-se um Analisador Beckman, modelo 120C. As amostras foram congeladas em N₂ líquido e fechadas à vácuo, seguida de hidrólise por 22 horas, a 110° C. O hidrolizado final foi dissolvido em tampão citrato de sódio pH 2,2, possibilitando a leitura tanto para aminoácidos básicos como para os neutros e ácidos, exceto o triptofano.

Digestibilidade de Proteína

A digestibilidade "in vitro" das proteínas foi procedida de acordo com Akesson & Stahmann (1964), utilizando a hidrólise ácida com pepsina e a hidrólise alcalina com pancreatina.

Atividade da Antitripsina

A atividade antitripsina foi realizada pelo método de Kunitz (1947), com as modificações introduzidas por Kakade *et alii* (1969), empregando caseína como substrato e leitura a 280nm dos aminoácidos liberados na hidrólise. A unidade de tripsina (UT) é definida como o aumento de 0,01 unidades de absorvância a 280nm e a tripsina inibida (UTI) pela diferença entre as unidades da atividade máxima e as da amostra contendo o inibidor.

Atividade da Lectina

A atividade da lectina foi realizada segundo o método de Liener (1955), a partir da aglutinação dos eritrócitos triplicinizados de coelho.

Quociente de Eficiência Protéica

O Quociente de Eficiência Protéica (PER) foi determinado segundo a metodologia de Allison (1964), com as modificações introduzidas por Friedman (1975), utilizando 10% de proteínas nas dietas e 10% de fonte protéica da caseína, como padrão.

Digestibilidade Aparente da Proteína

A digestibilidade aparente da proteína foi determinada pela diferença entre o Nitrogênio protéico ingerido e o excretado nas fezes dos ratos.

Valor Biológico Aparente

O Valor Biológico Aparente, nos ratos, foi determinado pelo quociente do nitrogênio protéico retido pelo absorvido (balança de nitrogênio) e multiplicado por 100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química das cultivares de feijão aparece na Tabela 1. O teor de proteína variou de 23,37 a 25,77%, estando na faixa de variação protéica das leguminosas, segundo Pant & Tulsiani (1969). O nitrogênio não-protéico apresentou o valor mais elevado para o feijão Rico 23, bem como os de cinza, extrato etéreo e fibra bruta. As avaliações dos demais parâmetros físico-químicos estão de acordo com os obtidos por Moraes & Angelucci (1971), entre outros pesquisadores.

TABELA 1: Composição química de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Componentes	Cultivares			
	Rico 23	Rosinha-G2	Carioca	Piratã-1
(% base seca)				
Proteína	25,53	25,77	23,37	23,62
Nitrogênio não-protéico	4,88	3,75	3,99	3,38
Cinzas	4,20	3,79	4,18	3,58
Extrato etéreo	2,12	1,85	1,45	1,25
Fibra	5,67	4,57	3,82	4,13
Carboidratos	62,48	63,92	67,18	67,42

A composição em aminoácidos das 4 cultivares de feijão estudadas está na Tabela 2. Os resultados foram semelhantes entre as cultivares, exceto no conteúdo de lisina e metionina. Este último aminoácido foi limitante

em todas as cultivares, conforme já observado por diversos autores, entre os quais Bressani *et alii* (1961) e Evans *et alii* (1974).

TABELA 2: Perfil de aminoácidos nas proteínas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Aminoácidos (g/16gN)*	Cultivares			
	Rico 23	Rosinha-G2	Carioca	Piratã-1
Lisina	8,77	8,80	6,84	6,54
Histidina	2,27	2,23	2,53	2,94
Amônia	1,73	2,18	1,85	1,56
Arginina	4,97	6,40	6,22	5,14
Triptofano **	1,02	1,03	1,17	1,32
Ácido aspártico	13,80	14,51	12,47	14,12
Treonina	4,70	5,17	4,21	4,53
Serina	6,63	6,62	5,97	5,92
Ácido glutâmico	20,74	19,53	18,32	19,41
Prolina	4,05	3,86	3,34	3,67
Glicina	4,40	4,35	3,65	3,99
Alanina	4,81	4,52	3,86	4,23
1/2 Cistina ***	1,51	1,11	1,12	1,31
Valina	5,57	6,15	4,06	4,35
Metionina ***	1,42	1,30	1,13	1,22
Isoleucina	4,75	4,62	3,26	3,50
Leucina	9,94	9,70	7,27	7,75
Tirosina	2,47	2,56	2,37	2,60
Fenilalanina	5,52	5,87	5,00	5,62

* Troca iônica segundo Spackman e col., 1958, Analisador beckman 120C.

** Método colorimétrico de Spies, 1967.

*** Determinado como ácido cistéico e metionina sulfona, respectivamente.

A atividade "in vitro" dos fatores antinutricionais, lectina e antitripsina, aparece na Tabela 3. A maior atividade desses inibidores foi encontrada nas cultivares Piratã-1 e Rico 23. Entretanto os valores

médios de atividade estão de acordo com os obtidos em feijão integral (cru) por Kakade & Evans (1965), Liener (1976) e outros.

TABELA 3: Atividade dos fatores antinutricionais de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Cultivares	Inibidor de tripsina (UTI/mg Prot)*	Lectinas (μ g Prot/ml)**
Rico-23	148,50	0,35
Rosinha-G2	161,30	0,49
Carioca	136,80	0,78
Piratã-1	183,60	0,36

* Unidades de tripsina inibida por mg de proteínas.

** Concentração mínima de proteínas, na mistura de reação, capaz de provocar aglutinação dos eritrócitos tripsinizados de coelho.

No estudo "in vivo" a toxicidade dos feijões foi extremamente elevada, provocando letalidade total dos ratos alimentados com dieta contendo feijão cru num intervalo de 2 a 9 dias, Tabela 4. Bressani *et alii* (1963) e Kakade & Evans (1965), estudaram a letalidade de ratos alimentados com outras cultivares e também constataram essa enorme toxicidade. A toxicidade aguda do feijão cru não parece ser devida, exclusivamente, a ação dos agentes antinutricionais, antitripsina e lectina,

uma vez que outros, altamente tóxicos, ainda não identificados, podem estar presentes, contribuindo para o efeito tóxico total. Esses compostos desconhecidos podem ser altamente termolábeis, pois tratamento térmico brando, insuficiente para eliminar os antinutricionais identificados, diminui a toxicidade aguda, melhorando o valor biológico das proteínas da dieta, Antunes (1979).

TABELA 4: Toxidez biológica de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) cru*

Cultivares	Peso corporal (g/rato/dia)	Ingestão de dieta (g/rato/dia)	Letalidade dos ratos (dias)
Rico-23	- 1,45	2,81	4 a 8
Rosinha-G2	- 1,41	2,78	4 a 8
Carioca	- 1,32	3,12	4 a 9
Piratã-1	- 1,64	2,96	2 a 7
Padrão caseína	+ 2,49	7,83	-----

* Ratos desmamados, linhagem Wistar, em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*.

Os parâmetros biológicos das Tabelas 5 e 6 mostram o valor nutricional das diferentes cultivares de feijão estudadas. A cultivar Rico 23 apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros biológicos, evidenciando uma proteína com melhor perfil de aminoácidos essenciais do que as demais cultivares. Os resultados da Tabela 2 confirmam que os teores dos

aminoácidos lisina e sulfurados (metionina e 1/2 cistina) são maiores para a cultivar Rico 23, justificando seu melhor desempenho nutricional, a despeito de sua baixa digestibilidade. A digestibilidade entre 50 e 69,5% é baixa para as cultivares de feijão, quando comparada com a de outras leguminosas, que podem apresentar valores de até 90%, segundo Sgarbieri (1978).

TABELA 5: Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Cultivares	Digestibilidade (%)			
	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i> ¹	
	cru	cozido ²	cru	cozido ²
Rico-23	39,2	60,5	- ³	50,0
Rosinha-G2	45,2	66,2	- ³	58,0
Carioca	43,9	62,8	- ³	64,5
Piratã-1	45,0	65,5	- ³	69,5
Padrão caseína	99,3	-	93,37	-

1 Ratos desmamados, linhagem "Wistar", em gaiolas com água e comida *ad libitum*, por 10 dias.

2 Feijão macerado por 12 horas e cozido por 1 hora sob pressão normal.

3 Os ratos morreram durante o teste.

TABELA 6: Avaliação nutricional das proteínas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) cozida

Avaliações	Cultivares				Padrão caseína
	Rico 23	Rosinha-G2	Carioca	Piratã-1	
Quociente de Eficiência Proteica (PER) *	1,32	0,85	0,75	1,12	3,40
Valor biológico Aparente (%)	58,90	38,30	39,40	49,70	84,20
Balanço de nitrogênio (mg retidos/rato/dia)	36,10	24,00	21,10	29,20	140,70

* Ratos desmamados, linhagem Wistar, em gaiolas com água e comida *ad libitum*.

A baixa digestibilidade no feijão cru é atribuída à atividade dos inibidores de proteases, que diminuem a atividade das enzimas digestivas. O tratamento térmico do feijão, no processo de cozimento, inativa os inibidores de proteases, promovendo um efeito benéfico na digestibilidade, conforme Tabela 5. Mesmo assim, a digestibilidade das proteínas do feijão não melhorou além de 69,50%, após o cozimento.

CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que as cultivares de feijão estudadas, se administradas cruas, são altamente tóxicas, provocando letalidade nos ratos do ensaio biológico, num período extremamente curto.

O cozimento melhora a digestibilidade do feijão, tanto "in vitro" como "in vivo", sem atingir 70%.

O Coeficiente de Eficácia Protéica corresponde a 1/3 do padrão e o nitrogênio retido corresponde a apenas 25% do total contido na dieta com feijão cozido.

A cultivar Rico 23 apresenta o melhor perfil nutricional entre os feijões estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKESON, W. R. & STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J Nutr.**, **83**:257, 1964.
- ALLISON, J. B. The nutritive value of dietary proteins. In MUNRO, H.N. & ALLISON, J.B. ed. Mammalian Protein Metabolism. New York, Academic Press, 1964. v.2 p.45.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Cereal laboratory methods. St. Paul, Minnesota, 1975.
- ANTUNES, A. J. & MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. **J. Agric. Food Chem.**, **25**:1096, 1977.
- ANTUNES, P. L. Composição e propriedades nutricionais das proteínas do feijão Rosinha-G2 (*Phaseolus vulgaris*, L.). Campinas. 1979. Tese (Doutorado). Fac. Eng. Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- BALDI, G. & SALAMINI, F. Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species. **Theorit. App1. Genetics**, **43**:75, 1973.
- BECKER, H. C. ; MILNER, R. T. & NAGEL, R.H. A method for the determination of nonprotein nitrogen in soybean meal. **Cereal Chem.**, **17**:447, 1940
- BORCHERS, R.; ACKERSON, C. W. & SANDSTEDT, R. M. Trypsin inhibitor. III. Determination and heat destruction of the trypsin inhibitor of soybeans. **Arch. Biochem.**, **12**:367, 1947.
- BOWMAN, D. E. Fractions derived from soy beans and beans which retard tryptic digestion of casein. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **57**:139, 1944.
- BRESSANI, R. ; ELIAS, L. G. & NAVARRETE, D.A. The essential amino acid content of samples of black beans, red beans, rice beans, and cowpeas of Guatemala. **J. Food Sci.**, **26**:525, 1961.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. & VALIENTE, A. T. Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans(*Phaseolus vulgaris*, L). **Brit. J. Nutr.**, **17**:69, 1963.
- BURKARD, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2ª ed. Buenos Aires, Acme Agency, 1952.
- EVANS, R. J.; BAUER, D.H.; SISAQ, K. A. & RYAN, P. A. The availability for the rat of methionine and cystine contained in dry bean seed. **J. Agric. Food Chem.**; **22**:130, 1974.
- FAO/WHO. Expert Group. **Who Tech. Rept. Sez.**; **301**:36, 1965.
- FRIEDMAN, M., ed. Protein nutritional quality of foods and feeds. New York, Marcell Dekker, 1975. v.1, pt. 1 - 2.
- HAM, W. & SANDSTEDT, R. M. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal. **J. Biol. Chem.**, **154**:505, 1944.
- HANOVAR, P. M. ; SHIH, C. V. & LIENER, I. E. Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. **J. Nutr.**, **77**:109, 1962.
- JAFFÉ, W.G. Factores tóxicos en leguminosas. **Arch. Latinoam. Nutr.**, **18**:205, 1968.
- JAFFÉ, W.G. & GAEDE, K. Purification of a toxic phytohaemagglutinin from black baens (*Phaseolus vulgaris*). **Nature** (London), **183**:1329, 1959.
- JAFFÉ ,W.G. & HANNIG, K. Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Biochem. Biophys.**, **109**:80, 1965.
- KAKADE, M. L. & EVANS, R.J. Growth inhibition of rats fed navy bean fractions. **J.Agric. Food Chem.**, **13**:450,1965.
- KAKADE, M. L.; SIMONS, N. & LIENER, I. E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chem.**, **46**:518, 1969.
- KAPLAN, L.; Arqueology and domestication in american *Phaseolus* (beans). **Econ. Bot.**, **19**:358, 1965.
- KUNITZ, M.; Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. **J. Gen. Physiol.**, **30**:291, 1947.
- LANDSTEINER, K. & KAUBITSCHKEK, L.; Beobachtungen über hämolyse und hämagglutination. **Zbl. Bakt. Abt., II**, **45**:660, 1908.
- LANTZ, E. M.; GOUGH, H. W. & CAMPBELL, A. M. Effect of variety, location, and years on the protein and amino acid content of dried beans. **J. Agric. Food Chem.**, **6**:58, 1958.
- LIENER, I. E. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. **J. Food Sci.**, **41**:1076, 1976.

- LIENER, I. E. The photometric determination of hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**:223, 1955. used proteins. In GOULD, R. F. World Protein Resources. Washington, D.C., American Chemical Society, 1966. p.178-193 (Advances in Chemistry Series, 57).
- MORAES, R. M. & ANGELUCCI, E. Chemical composition and acid contents of brazilian beans *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Sci.*, **36**:493, 1971.
- PANT, R. & TULSIANI, D. R. P. Solubility, amino acid composition, and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **17**:361, 1969.
- RIGAS, D. A. & OSGOOD, E. E. Purification and properties of the phytohemagglutinating of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, **212**:607, 1955.
- SGARBIERI, V. C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família *Leguminosae*. *Ciência e Cultura*, 1978.
- SHARON, N. & LISS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, **177**:949, 1972.
- SILVA, V. R. & IACHAN, A. Proteins from varieties of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). I. Quantification and fractionation of proteins. *Rev. Brasil. Tecnol.*, **6**:133, 1975.
- SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt. Chem.*, **30**:1190, 1958.
- SPIES, J. R. Determination of Tryptoflan in proteins. *Analyt. Chem.*, **39**: 1412, 1967.
- TANDON, O. B.; BRESSANI, R. & SCRMSHAW, N. S. Nutrients in Central American beans. *J. Agric. Food Chem.*, **5**:137, 1957.
- WAGNER, L. P. & RIEHM, J. P. Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor isolated from the navy bean. *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**:672, 196