

MODIFICAÇÕES BIOQUÍMICAS E FÍSICAS EM GRÃOS DE FEIJÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO (1)

HAIKO ENOK SAWAZAKI (2, 4), JOÃO PAULO FEIJÃO TEIXEIRA (2, 4),
ROBERTO MACHADO DE MORAES (2) e EDUARDO ANTÔNIO BULISANI (3, 4)

RESUMO

Procurou-se estudar parâmetros químicos e físicos que pudessem avaliar, em três épocas, a qualidade de grãos de feijão durante onze meses de armazenamento, utilizando os cultivares Carioca e Rico 23. Eletroforese das frações globulinas em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil sódico (SDS), indicou um aumento no final do número de bandas, porém o fato poderia ser conseqüência de uma maior concentração protéica da amostra, sendo praticamente mantidos durante o estudo os pesos moleculares das subunidades polipeptídicas principais das proteínas G₁ e G₂, de cerca de 50.000-43.000 e 18.000 respectivamente. As porcentagens de proteína, umidade e açúcar solúvel não sofreram alterações sensíveis, enquanto a de lipídio diminuiu e a de fibra aumentou. O teor de amido também aumentou, provavelmente em vista da maior extratibilidade. O índice de peróxido e o teor de ácidos graxos livres aumentaram, sendo comprovada, por este último, a elevação do índice de acidez. A capacidade de hidratação aumentou inicialmente, permanecendo depois constante, e a porcentagem de sementes com tegumento duro não pareceu sofrer alteração. O comportamento dos dois cultivares foi semelhante.

Termos de indexação: feijão; modificações bioquímicas durante armazenamento; eletroforese em gel de poliacrilamida da fração globulina.

(1) Recebido para publicação em 4 de junho de 1984.

(2) Seção de Fitoquímica, Instituto Agrônomico (IAC), Caixa Postal 28, 13100 – Campinas (SP).

(3) Seção de Leguminosas, IAC.

(4) Com bolsa de suplementação do CNPq.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas presentes nas sementes são de dois tipos: metabólica, que pode ser enzimática, responsável pela atividade celular normal como a síntese das do segundo tipo, a estrutural ou de reserva. As proteínas de reserva, junto com os carboidratos ou/e óleos, são sintetizados durante o desenvolvimento da semente. Elas funcionam após a germinação da semente, quando, subsequente à hidrólise, fornecem nitrogênio, esqueletos de carbono e energia para o desenvolvimento das plântulas. Ocorrem dentro da célula em pequenos corpos protéicos, requerendo funcionalmente alto conteúdo de nitrogênio, habilidade para fornecer corpos protéicos, resistir à dessecação, e serem rapidamente hidrolisadas pelas enzimas proteolíticas das sementes em germinação.

As globulinas das sementes de leguminosas (proteínas de reserva) são, em larga escala, importante fonte de proteína alimentar. A manipulação da composição genética dessas proteínas tornou-se prioritária nos esforços para aumentar o valor nutricional das sementes de leguminosas.

É conhecido que a qualidade de grãos de feijão, indicada pelo sabor e textura, diminui com o tempo de armazenamento e com o aumento da acidez lipídica (HERMAN & WOOD, 1956; HUGHES & SANDSTED, 1975) e que as modificações organolépticas são principalmente devidas a reações que ocorrem na cutícula. A relação entre a formação de pectatos de cálcio e magnésio, que são insolúveis, e a dificuldade de cozimento, não foi observada para sementes de feijão (KON, 1968). Sabe-se, porém, que temperatura e umidade relativa altas durante o armazenamento influem no aumento da acidez dos lipídios e no tempo de cozimento (BURR et alii, 1968; HUGHES & SANDSTED, 1975). MOLINA et alii (1975) e JORDÃO & STOLF (1970) não encontraram variações significativas na proteína de sementes cruas ou cozidas de feijão durante o armazenamento. Esses autores, porém, utilizaram somente o valor de proteína bruta para o estudo.

STOCKMAN et alii (1976) salientaram que um dos principais obstáculos no estudo da globulina de sementes de leguminosa tem sido a dificuldade em obter preparações homogêneas dessa proteína. O sucesso parcial conseguido com as separações baseadas na solubilidade é devido principalmente ao fato de que as principais globulinas de reserva estão presentes em altas concentrações na semente, mas a maioria das preparações das globulinas das sementes de leguminosas isoladas por esses métodos mostram bandas menores de contaminantes após a separação eletroforética.

Sementes secas de feijão contêm, em média, 20 a 30% de proteína em peso, dependendo do cultivar (KELLY & BLISS, 1975). Dessa proteína, 50 a 75% é globulina, requerendo grande quantidade de sal para so-

lubilizá-la. A globulina foi separada por DANIELSSON (1949) em duas frações chamadas legumina (fração solúvel em alta quantidade de sal) e vicilina (fração solúvel em baixa quantidade de sal). McLEESTER et alii (1973) e ROMERO et alii (1975) designaram-nas respectivamente G_1 e G_2 .

No presente trabalho, procurou-se estudar alterações nos constituintes das globulinas de reserva resultantes do tempo de armazenamento, assim como de parâmetros químicos e físicos que poderiam influir na qualidade dos grãos de feijão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) dos cultivares Carioca e Rico 23 fornecidas pela Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas. Os ensaios foram realizados com grãos armazenados em embalagem plástica em condição ambiente, por períodos de um, seis e onze meses após a colheita. Os grãos foram avaliados para verificar modificações nas frações protéicas através de extração, separação e caracterização de globulinas, e perda de qualidade, mediante parâmetros físicos e químicos.

A extração foi feita com tampão fosfato pH 7,6 e a separação das globulinas, por diálise e solubilidade a pH 7,0 e 4,7, conforme o esquema da figura 1.

As frações globulina G_1 (N_5) e globulina G_2 (N_4), que representam a maior fração protéica, foram caracterizadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida; N,N-metilenodiacrilamida; N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) com sulfato dodecil sódico (SDS) utilizando método descrito por LAEMMLI (1970) com modificações. O gel de corrida a 10%, pH 8,8, e o gel de sobreposição a 5%, pH 6,8, volumes de 60 microlitros, foram utilizados em géis de 7,0 X 0,5 cm para a eletroforese em tampão pH 8,3, 3,5 mA/gel. As soluções protéicas foram preparadas a 1mg/ml, tampão pH 7,0 com 10% de mercaptoetanol e 5% de SDS por reação de três minutos com água fervente, seguida pela adição de 10% de glicerol e 0,001% de azul-de-bromofenol. A coloração dos géis foi feita com solução de Coomassie Brilliant Blue e, a descoloração, com solução de ácido acético-metanol. A mobilidade das bandas foi calculada pela equação:

$$RM = \frac{\text{distância migração proteína}}{\text{comprimento após descoloração}} \times \frac{\text{comprimento antes coloração}}{\text{distância migração azul-de-bromofenol}}$$

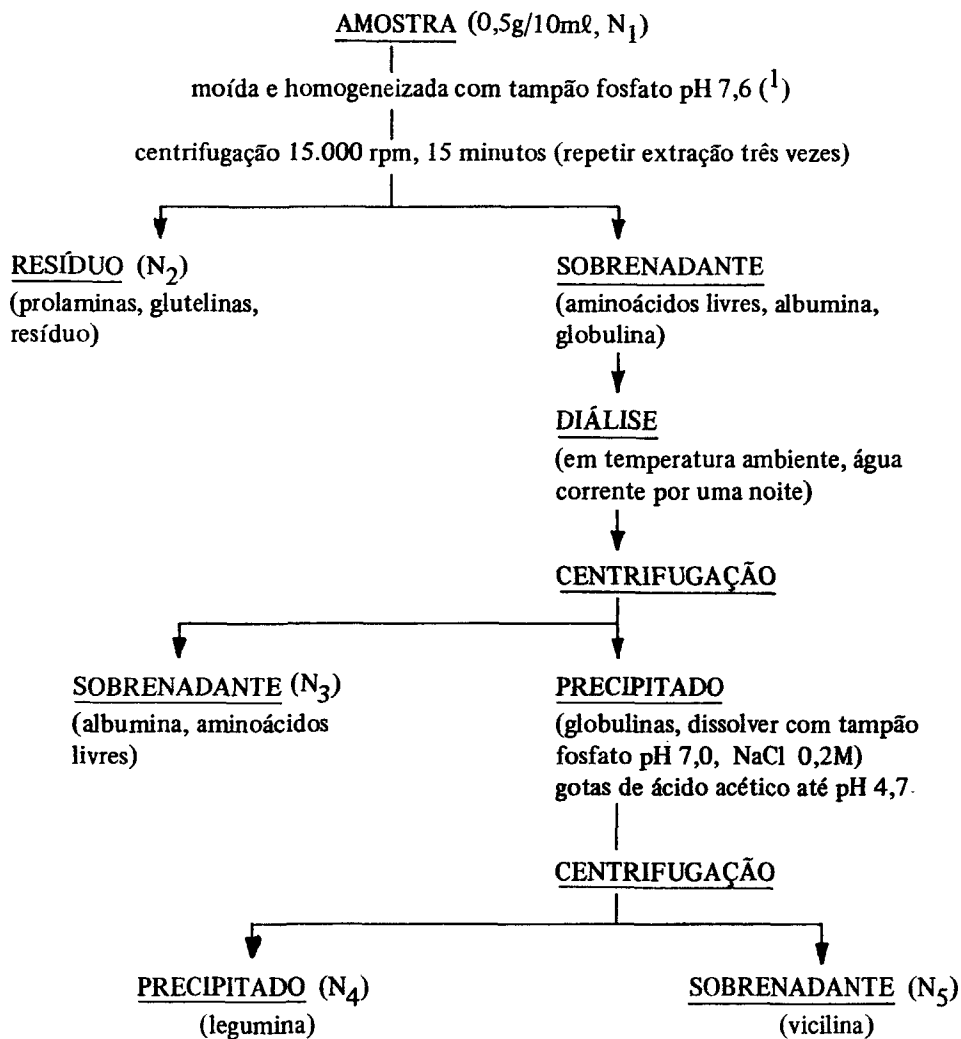


FIGURA 1. Extração e separação de frações protéicas de sementes de feijão
(Nitrogênio total = $N_1 = N_2 + N_3 + N_4 + N_5$).

⁽¹⁾ Tampão fosfato pH 7,6 foi obtido pela mistura de solução M/15 Na_2HPO_4 , e solução M/15 KH_2PO_4 e adicionando NaCl para valor final de 0,2M e mercaptoctanol para concentração de 14mM.

Para a elaboração da curva padrão e determinação dos pesos moleculares, em dáltons, utilizaram-se padrões de albumina de soro bovino (BSA, PM = 68.000), ovalbumina (OV, PM = 43.000) e lisozima (LSZ, PM = 14.300).

Na farinha dos grãos armazenados pelos períodos descritos, efetuaram-se as determinações dos teores de: a) umidade, b) nitrogênio total para obtenção do teor de proteína (BATAGLIA et alii, 1978); c) fibras, através de digestão com ácido tricloroacético (BEYTHIEN-DIEMAIR, 1963); d) amido, após extração com ácido perclórico, e avaliação colorimétrica de glicose (DUBOIS et alii, 1956); e) lipídios por Soxhlet (TRIEBOLD & AURAND, 1963). Para a avaliação dos ácidos graxos, fez-se inicialmente a separação dos lipídios na fase de ácidos graxos livres e, na de glicerol, através da neutralização com álcali em presença de fenoltaleína em álcool isopropílico. Os ácidos graxos saponificados foram então liberados por acidificação, extraídos com solvente e esterificados, assim como o glicerol. A esterificação foi realizada de acordo com HARTMAN & LAGO (1973), utilizando-se ácido sulfúrico-metanol-cloreto de amônio, e analisados por cromatografia gasosa mediante fase líquida DEGS 10%.

O índice de peróxido foi determinado pelo método oficial Cd-8-53 e o valor ácido através do método Cd-3a-63, todos da AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (1975).

A porcentagem de sementes de tegumento duro (que não absorveram água a 25°C após seis horas de embebição), e a capacidade de hidratação (porcentagem de absorção de água em relação ao peso seco dos grãos), foram avaliadas segundo técnicas de ANTUNES & SGARBIERI, 1979.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da extração e separação das frações protéicas encontram-se no quadro 1. Os dados mostram que a extração de proteínas ($N_3 + N_4 + N_5$) aumentou no decorrer das três épocas, passando de 58 a 68 e a 84% para o 'Carioca' e de 53 a 58 e a 76% para o 'Rico 23'. A porcentagem de proteína (Quadro 2) quase não se alterou, o que não significa a manutenção da qualidade protéica, visto que ANTUNES & SGARBIERI (1979) relataram redução nos parâmetros de taxa de eficiência protéica (PER), disponibilidade de metionina e cisteína e digestibilidade aparente in vivo de proteínas de feijão em função do tempo nas condições de 12, 25 e 37°C e 52, 65 e 76% de umidade relativa respectivamente. A fração solúvel em pH 4,7, ou vicilina (N_5) foi quantitativamente superior à insolúvel, sugerindo ser a globulina G_1 ou glicoproteína II (PUSZTAI & WATT, 1970; BARKER et alii, 1976), e representa a maior fração protéica entre as proteínas de feijão, ficando a insolúvel ou legumina (N_4), como a globulina G_2 .

QUADRO 1 – Teor de proteína total nas frações protéicas (N_3 , N_4 , N_5), no resíduo da extração (N_2) e nos grãos (N_1) de feijão cv. Carioca e Rico 23, nas três épocas de amostragem, após um, seis e onze meses de armazenamento

Frações protéicas (¹)	Épocas de amostragens					
	1		2		3	
	%P/M.S. (²)	%	%P/M.S. (²)	%	%P/M.S. (²)	%
cv. Carioca						
N_1	19,6	100	18,5	100	18,4	100
N_2	8,2	42	5,9	32	3,0	16
N_3	5,6	29	6,4	35	8,1	44
N_4	2,0	10	2,6	14	3,4	18
N_5	3,8	19	3,6	19	4,0	22
cv. Rico 23						
N_1	17,8	100	18,4	100	17,8	100
N_2	8,4	47	7,6	41	4,3	24
N_3	5,0	28	4,5	24	7,7	43
N_4	1,6	9	2,7	14	2,5	14
N_5	2,8	16	3,8	20	3,4	19

(¹) N_1 : semente integral; N_2 : resíduo da extração protéica; N_3 : albumina e aminoácidos livres; N_4 e N_5 : globulinas. (²) Proteína (nitrogênio total x 6,25)/matéria seca.

A caracterização da fração globulina e as bandas dos padrões protéicos por eletroforese em gel de poliácridamida SDS é apresentada nas figuras 2, 3 e 4 por representação esquemática das bandas protéicas e, dos géis com um e onze meses, na figura 5.

Os valores encontrados para as mobilidades relativas (R_m) e os logaritmos dos pesos moleculares dos padrões protéicos (BSA), (OV) e (LZS), forneceram as retas e os coeficientes de regressão, $\log PM = 5.901 - 1.704 R_m$ ($r^2 = 0,899$); $\log PM = 5.520 - 1.459 R_m$ ($r^2 = 0,931$); $\log PM = 5.373 - 1.467 R_m$ ($r^2 = 0,918$) respectivamente, para a primeira, segunda e terceira época.

Pela figura 2 (primeira época de amostragem), verifica-se que na fração globulina total do cv Carioca foram identificadas três bandas principais de PM: 18.000, 42.000 e 47.200 dáltons e para o cv Rico 23: 18.000, 42.000 e 45.400. A fração globulina solúvel a pH 4,7 do 'Carioca' apresentou as bandas principais de PM: 21.500, 42.000 e 47.200, e a do 'Rico 23': 21.500, 43.700 e 47.200. Sendo a globulina G_1 a maior fração protéica, as bandas fortes (que coram com maior intensidade) de PM 42.000 – 47.200 e 43.700 – 47.200 representariam suas subunidades peptídicas. Outros autores encontraram que os polipeptídeos da G_1 , ou ocupam uma única posição sobre géis de SDS poliacrilamida (MA YU & BLISS, 1978) ou correspondem a três frações protéicas (α , β , γ) de PM: 53.000, 47.000 e 43.000 respectivamente (SUN et alii, 1974) ou três frações de PM 50.000 – 47.000, principal, e as de 32.000 e 23.000 (BARKER et alii, 1976). A outra banda forte de PM 21.500 pode, portanto, pertencer à fração G_1 , ou ser contaminação da fração insolúvel a pH 4,7, globulina G_2 , visto a precipitação no ponto isoelétrico necessitar de várias repetições para completa separação (DERBYSHIRE et alii, 1976). Esta banda apresentou o PM de 18.400 para ambos os cultivares, confirmando os dados em que os polipeptídeos da G_2 são menores que os da G_1 (MA YU & BLISS, 1978), e parcialmente os que encontram para a G_2 uma proteína que se dissocia nas subunidades peptídicas de PM 60.000 e 20.000 (BARKER et alii, 1976; DERBYSHIRE & BOULTER, 1976).

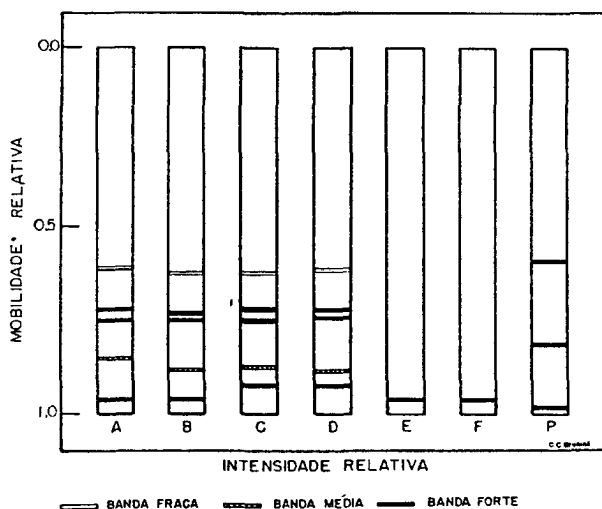


FIGURA 2 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações protéicas dos cultivares Carioca e Rico 23 obtidas na primeira época. A: globulina do 'Carioca'; B: globulina do 'Rico 23'; C: fração G_1 do 'Carioca'; D: fração G_1 do 'Rico 23'; E: fração G_2 do 'Carioca'; F: fração G_2 do 'Rico 23'; P: Padrões (BSA, PM = 68.000; OV, PM = 43.000; LSZ, PM = 14.300).

Na figura 3 (segunda época de amostragem), verifica-se que na fração globulina total, foram identificadas no 'Carioca' três bandas fortes de PM 18.500, 42.700 e 50.500, e, no 'Rico 23' 18.500, 47.200 e 52.200, as restantes médias e fracas. A fração solúvel em pH 4,7 apresentou para o 'Carioca' as bandas fortes de PM 42.700 e 50.500, e, para o 'Rico 23', 48.800 e 52.200, as restantes médias e fracas. A fração insolúvel a pH 4,7 apresentou a banda de PM 18.500 para ambos os cultivares. Verifica-se que, apesar do maior número de bandas, ocorre a similaridade das mais fortes com relação às da primeira época, sendo que o aumento do número de bandas pode ser consequência de maior concentração protéica da amostra e melhor corrida eletroforética.

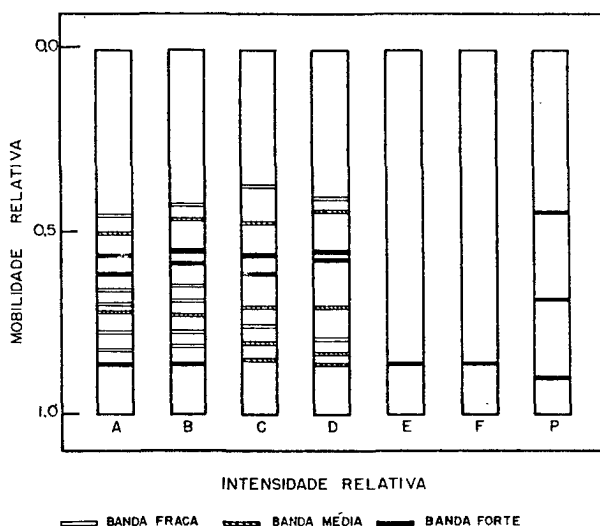


FIGURA 3 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações protéicas dos cultivares Carioca e Rico 23 obtidas na segunda época. A: globulina do 'Carioca'; B: globulina do 'Rico 23'; C: fração G₁ do 'Carioca'; D: fração G₁ do 'Rico 23'; E: fração G₂ do 'Carioca'; F: fração G₂ do 'Rico 23'; P: Padrões (BSA, PM = 68.000; OV, PM = 43.000; LSZ, PM = 14.300).

Na figura 4 (terceira época de amostragem) verifica-se que na fração globulina total foram identificadas no 'Carioca' três bandas fortes de PM, 18.800, 46.000 e 50.000, e no 'Rico 23', 18.100, 43.600 e 50.000, as restantes médias e fracas. A fração solúvel a pH 4,7 do 'Carioca' apresentou as bandas fortes de PM 45.100, 51.600 e, a média, 22.200, e, a do 'Rico 23', as bandas fortes de PM 20.500, 43.600 e 49.900, as demais médias e fracas.

A fração insolúvel a pH 4,7 apresentou a banda forte de PM 18.800 para o 'Carioca' e 18.100 para o 'Rico 23', com sinais de bandas contaminantes fracas da G_1 , revelando novamente a similaridade das bandas fortes com relação às demais épocas. Apesar das ligeiras diferenças nos pesos moleculares das subunidades, as quais podem ser atribuídas às variações decorrentes das diversas épocas de realização, verifica-se não terem ocorrido mudanças consideráveis nos perfis das frações protéicas, no decorrer das três épocas, evidenciando não ter havido degradação protéica na semente após 11 meses de armazenamento. Isso não implica necessariamente na manutenção da qualidade protéica, visto o teor de metionina ser considerado baixo nas globulinas (BLISS, 1978).

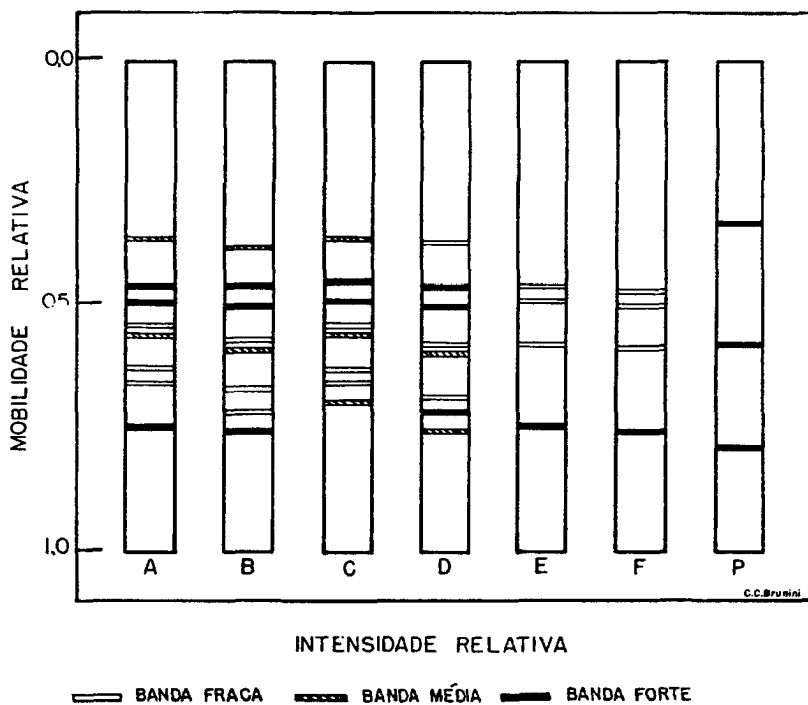


FIGURA 4 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações protéicas dos cultivares Carioca e Rico 23 obtidas na terceira época. A: globulina do 'Carioca'; B: globulina do 'Rico 23'; C: fração G_1 do 'Carioca'; D: fração G_1 do 'Rico 23'; E: fração G_2 do 'Carioca'; F: fração G_2 do 'Rico 23'; P: Padrões (BSA, PM = 68.000; OV, PM = 43.000; LSZ, PM = 14.300).

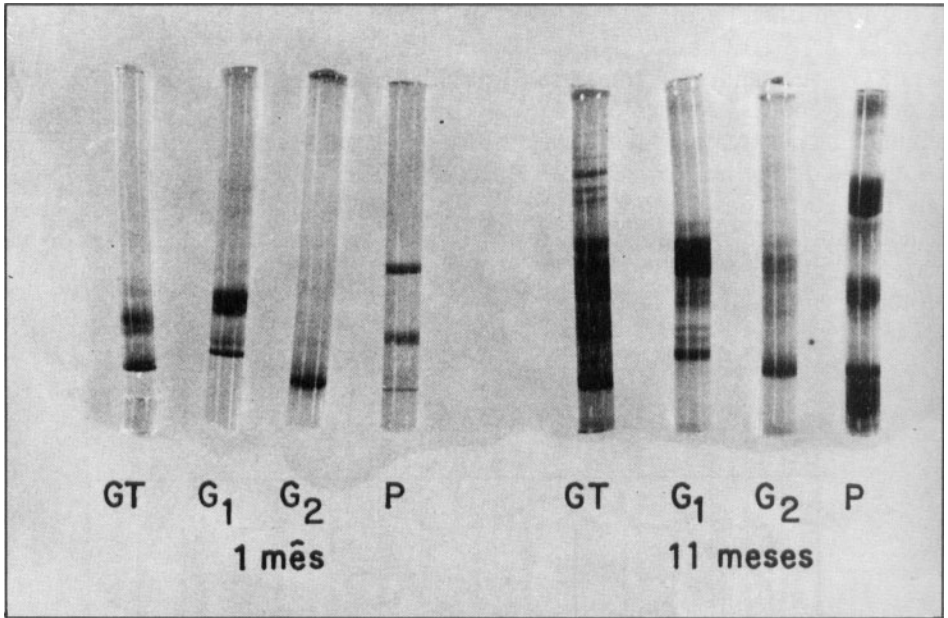


FIGURA 5 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações protéicas do cultivar Carioca obtidas na primeira (1 mês) e terceira época (11 meses). GT: globulina total; G₁: globulina G₁; G₂: globulina G₂; P: padrões.

Os dados do quadro 2 demonstram que a umidade, teor de açúcar e teor protéico da farinha quase não se alteraram. As fibras e o teor de amido aumentaram, enquanto os lipídios diminuíram. O fato de o teor de amido ter aumentado poderia ser atribuído a um problema de extração, pois TEIXEIRA et alii (1980), estudando grão de soja armazenados, encontraram aumento do teor de alguns compostos, o que se atribui à perda de seletividade de membranas celulares que provocaria maior eficiência na extração desses compostos.

QUADRO 2 – Variação da composição química de grãos de feijão dos cultivares Carioca e Rico 23, durante 11 meses de armazenamento, em três épocas de amostragem (1, 2 e 3)

Cultivar	Umidade			Proteína			Fibras		Açúcares solúveis			Amido			Lipídios	
	1	2	3	1	2	3	1	3	1	2	3	1	2	3	1	3
	%															
Carioca	14,1	14,2	13,6	19,7	18,5	18,4	4,9	6,7	6,6	7,3	6,7	24,3	46,3	61,6	1,7	1,5
Rico 23	12,7	12,9	12,6	17,8	18,4	17,8	5,8	7,3	6,3	6,9	6,4	24,8	44,7	59,3	2,4	1,6

Os dados do quadro 3 sugerem que a acidez na primeira época de amostragem deva estar superestimada, pois não foi utilizado o antioxidante BHT (hidróxido tolueno butilado). Nota-se, porém, que pareceu ocorrer ligeira elevação da acidez, tendo o índice de peróxido aumentado para ambos os cultivares.

QUADRO 3 — Variação na composição química de grãos de feijão cv. Carioca e Rico 23, durante um ano de armazenamento, em três épocas de amostragem (1, 2 e 3)

Cultivar	Índice de acidez			Índice de peróxido		
	1	2 mg KOH/g óleo	3	1	2	3 equivalente peróxido/g óleo
Carioca	21,0	21,2	21,8	8,7	13,7	18,5
Rico 23	21,0	19,6	20,5	8,8	17,5	23,3

No quadro 4, confirma-se o observado; os ácidos graxos aumentaram com o decorrer do armazenamento. Não foi visível a diminuição dos ácidos graxos insaturados que levam à formação dos peróxidos lipídicos, com a formação concomitante de compostos carbonilos que reagem com os grupos ativos aminados das proteínas formando o pigmento responsável pelo 'browning'. Os peróxidos, por sua vez, oxidam os grupos sulfidrila protéicos dos aminoácidos sulfurados, tornando os aminoácidos não disponíveis (TANNENBAUM et alii, 1969; KAREL et alii, 1975).

Pelo quadro 5, verifica-se, para ambos os cultivares, que a porcentagem de água absorvida aumenta com a idade dos grãos até quatro horas de embebição; após seis horas de embebição, esse aumento só é verificado da primeira para a segunda época, indicando maior desorganização e, conseqüentemente, menor seletividade das membranas celulares dos grãos mais velhos.

Pelo quadro 6, observa-se que a porcentagem de sementes de tegumento duro não parece sofrer alteração, dados esses semelhantes aos encontrados por ANTUNES & SGARBIERI (1979) nas condições de armazenamento de 37°C e 76% de umidade relativa.

QUADRO 4 — Variação na composição da fração dos ácidos graxos livres e dos triglicerídios de grãos de feijão dos cultivares Carioca e Rico 23, durante 11 meses de armazenamento

Ácidos graxos	'Carioca'						'Rico 23'					
	1ª época		2ª época		3ª época		1ª época		2ª época		3ª época	
	AGL	T	AGL	T	AGL	T	AGL	T	AGL	T	AGL	T
Mirístico	14,6	8,7	11,6	12,8	6,7	11,1	6,8	6,7	9,5	9,6	6,3	7,5
Palmitico	77,8	54,8	92,5	56,0	59,2	52,5	99,0	48,4	87,1	53,0	57,7	53,0
Estearico	10,2	5,7	11,7	9,6	10,3	10,2	9,5	6,1	10,8	10,0	10,6	8,9
Oléico	71,5	31,9	57,8	47,0	46,8	42,6	56,8	38,5	43,9	47,9	49,1	43,2
Linoléico	143,5	186,8	171,9	180,1	177,9	187,3	194,9	176,6	123,1	148,2	163,0	165,5
Linolenico	127,0	161,0	149,5	144,0	199,0	196,1	90,6	168,3	136,1	190,5	213,2	222,0
Total	444,6	448,9	495,0	449,5	449,9	449,8	457,6	444,6	410,5	359,2	499,9	500,1
AGL + T	863,5	944,5	949,7	902,2	769,7	1000,0						

AGL: ácidos graxos livres; T: ácidos graxos de triglicerídios.

SUMMARY

BIOCHEMICAL AND PHYSICAL MODIFICATIONS OF BEAN SEEDS
DURING STORAGE

Seeds of dry beans cvs Rico 23 and Carioca, were chemical and physically characterized three times during eleven months of storage. Electrophoresis in polyacrylamide gel with SDS of the globulin fraction showed an increase in the number of bands at the third sampling, probably due to a more efficient protein extraction. However, molecular weight of the G₁ and G₂ subunits were constant, about 50,000–43,000 and 18,000, respectively. Total protein, soluble sugars and water contents did not change during storage, while fiber increased and lipids decreased. Starch content, as in case of globulin fraction, also increased due to greater extractability. Both free fatty acids content and peroxide value increased, according to the increase of the acidity value. Water absorption capability increased initially and leveled off thereafter. The percentage of seeds with hard coat was not affected by storage. The behaviour of the two cultivars was very similar.

Index terms: beans; biochemical modifications of beans seeds during storage; electrophoresis in polyacrylamide gel of the globulin fraction.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society. 3ed. rev. Champaign, 1975. 2v.
- ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V.C. Influence of time and conditions of storage on technological and nutritional properties of a dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Variety Rosinha G₂. Journal of Food Science, **44**(6): 1703-1706, 1979.
- BARKER, D.J.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A. & BOULTER, D. Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. Phytochemistry, **15**: 751-757, 1976.
- BATAGLIA, O.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; FURLANI, A.M.C. & GALLO, J.R. Métodos de análise química de plantas. Campinas, Instituto Agronômico, 1978. 31p. (Boletim técnico, 78)
- BEYTHIEN-DIEMAIR. Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker. Dresden, Theodor Steinhopff, 1963. 804p.
- BLISS, F.A. Improving the quantity and quality of bean protein. Madison, Univ. of Wisconsin, Dept. of Agriculture, 1978. 62p.
- BURR, H.K.; KON, S. & MORRIS, H.J. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. Food Technology, **22**: 336-337, 1968.

- DANIELSSON, C.E. Seed globulins of the gramineae and Leguminosae. *Biochemical Journal*, **44**:387, 1949.
- DERBYSHIRE, E. & BOULTER, D. Isolation of legumin-like protein from *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus aureus*. *Phytochemistry*, **15**: 411-414, 1976.
- ; WRIGHT, D.J. & BOLUTER, D. Review. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, **15**:3-24, 1976.
- DUBOIS, M.K.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; RIBERS, P.A. & SMITH, T. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**:350-356, 1956.
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, **22**:475-477, 1973.
- HERMAN, J.M. & WOOD, E.R. Influence of moisture content on keeping quality of dry beans. *Food Technology*, **10**(5):225-229, 1956.
- HUGHES, P.A. & SANDSTED, R.F. Effect of temperature, relative humidity, and light on the color of "California Light Red Kidney Bean" seed during storage. *HortScience*, **10**(4):421-423, 1975.
- JORDÃO, B.A. & STOLF, S.R. Armazenamento de feijão-de-mesa. *Cole-tânea do ITAL, Campinas*, **3**:217-252, 1970.
- KAREL, M.; SCHAICH, K. & ROY, R.B. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and aminoacids. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **23**(2):159-163, 1975.
- KELLY, J.D. & BLISS, F.A. Quality factors affecting the nutritive value of bean seed protein. *Crop Science*, **15**:757, 1975.
- KON, S. Pectic substances of dry beans and their possible correlation with cooking time. *Journal of Food Science*, **33**:437-438, 1968.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**:680-685, 1970.
- MA, YU & BLISS, F.A. Seed proteins of common bean. *Crop Science*, **18**:431-437, 1978.
- McLEESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M. & BLISS, F.A. Comparison of globulin protein from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. *Phytochemistry*, **12**:85, 1973.
- MOLINA, M.R.; FUENTE, G. de la & BRESSANI, R. Interrelationship between storage, soaking time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*, **40**:587-591, 1975.

- PUSZTAI, A. & WATT, W.B. Glycoprotein II. The isolation and characterization of a major antigenic and non haemagglutinating glycoprotein from *Phaseolus vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **207**:413-431, 1970.
- ROMERO, J.; SUN, S.M.; McLEESTER, R.C.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. Heritable variation in a polipeptide subunit of the major storage proteins of the bean *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, **56**:776, 1975.
- STOCKMAN, D.R.; TIMOTHY, C.H. & RYAN, D.S. Affinity chromatograph of the major seed protein in the bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomy Journal*, **61**:267, 1976.
- SUN, S.M.R.; MEC LEESTER, F.A.B. & HALL, T.C. Reversible and irreversible dissociation of globulins from *Phaseolus vulgaris* seed. *Journal of Biological Chemistry*, **249**:2118-2121, 1974.
- TANNENBAUM, S.M.; BARTH, H. & LEROUX, J.P. Loss of methionine in casein during storage with autoxidizing methyl linoleate. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **17**(6):1353-1354, 1969.
- TEIXEIRA, J.P.F.; SILVA, M.T.R.; MASCARENHAS, H.A.A. & MAEDA, J.A. Variação da composição química de sementes de três cultivares de soja, durante o armazenamento. *Bragantia*, Campinas, **39**:21-25, 1980.
- TRIEBOLD, H.O. & AURAND, L.N. Food composition and analysis. New York, Van Nostrand, 1963. 497p.