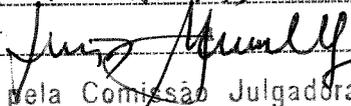




Instituto de Biologia

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
ELIANA P. CHAGAS

e aprovada pela Comissão Julgadora.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
ALBUMINAS E GLOBULINAS DE TRÊS CULTIVARES
BRASILEIROS DE *PHASEOLUS VULGARIS*

CAMPINAS - SP

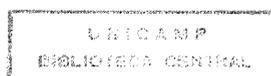
ELIANA PEREIRA CHAGAS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
ALBUMINAS E GLOBULINAS DE TRÊS CULTIVARES
BRASILEIROS DE *PHASEOLUS VULGARIS*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro

Universidade Estadual de Campinas
Campinas – SP – 1993



Ao meu Pedro
Aos meus pais, Aécio e Irene
Aos meus irmãos e à toda a minha família

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro, do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade, orientação e auxílio, na elaboração desta tese.
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.
- Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pela sua fundamental colaboração e auxílio em todas as etapas deste trabalho.
- Aos professores da pré-banca e da banca pela análise criteriosa, pelas sugestões e colaboração.
- Aos Departamentos de Bioquímica e Genética Molecular por ter facilitado a utilização dos equipamentos de laboratório.
- À Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas, pelo fornecimento do material vegetal.
- Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Dias Peres da Faculdade de Engenharia Elétrica pelas sugestões e auxílio na confecção desta tese.
- Ao Prof. Luiz Antonio Razera pelas sugestões e correções feitas neste trabalho.
- À amiga Ana Cecília Goés Horta, que durante esse período muito me ensinou, e que com sua alegria e entusiasmo, acompanhou a execução deste trabalho, o meu agradecimento especial.
- Aos amigos Ângela, Cláudia, Cyntia, Julieta, João Henrique, Vilma, Marcus, Leandro, Maristela, Giulio e Jamil pelo apoio, amizade, colaboração, compreensão, etc.
- Aos meus pais, Aécio e Irene, pelas sugestões, amizade, apoio, estímulo e paciência.
- Ao meu Maridão Pedro, por "tudo".
- Enfim, à todos aqueles encarnados ou desencarnados, que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho e puderam me compreender nos momentos mais difíceis.

"Parece-me que a Natureza trabalhou para os ingratos: somos felizes e nossos discursos são tais que parece que não o suspeitamos. Entretanto encontramos prazeres em toda parte; estão ligados a nosso ser e as penas não são senão acidentes. Em toda parte, os objetos parecem preparados para nossos prazeres: quando o sono nos chama, as trevas agradam-nos, e quando despertamos, a luz do dia encanta-nos. A Natureza é enfeitada de mil cores; os sons agradam nossos ouvidos; as iguarias têm gostos agradáveis, e, como se não bastasse a felicidade da existência, cumpre ainda que nossa máquina necessite ser reparada para nossos prazeres."
Montesquieu (1689-1755)

Conteúdo

Abreviaturas	vii
Resumo	viii
Summary	ix
Introdução	1
O Feijão	3
Origem e Evolução do Feijão	3
Proteínas do Feijão	4
Prolaminas e Glutelinas	5
Albuminas	5
Globulinas	5
Leguminas	6
Vicilinas	8
Faseolina	9
Lectinas	11
Objetivos	13
Metodologia Geral	15
Preparo do Material Vegetal	15
Extração das Proteínas	15
Dosagem de Proteínas	17
Eletroforese	17
Determinação das Proporções Relativas das Proteínas no gel	21
Análise de Aminoácidos	21

Análise Estatística	24
1 Albuminas	25
1.1 Métodos	25
1.2 Resultados	25
1.2.1 Extração das Albuminas	25
1.2.2 Análise Eletroforética da Fração Albumínica	27
1.2.3 Composição de Aminoácidos	27
1.3 Discussão	27
1.4 Conclusões	31
2 Globulinas	32
2.1 Métodos	32
2.1.1 Extração de Globulinas	32
2.1.2 Isolamento e Purificação de Faseolina	32
2.1.3 Reação de Degradação Enzimática da Faseolina	35
2.1.4 Precipitação Zonal	35
2.1.5 Avaliação da Faixa de Precipitação de Vicilinas e Proteínas Tipo legumina	36
2.1.6 Extração com NaCl	36
2.1.7 Preparo do Anticorpo	36
2.1.8 Teste de Imunodifusão-dupla	39
2.1.9 Grau de Glicosilação e Dosagem de Açúcares Totais	39
2.2 Resultados	39
2.2.1 Extração das Globulinas	39
2.2.2 Análise Eletroforética das Globulinas	40
2.2.3 Composição de Aminoácidos da Fração Globulínica	42
2.2.4 Comportamento Imunológico das Globulinas	42
2.2.5 Purificação e Isolamento da Faseolina	42
2.2.6 Estrutura da Faseolina	46
2.2.7 Composição de Aminoácidos da Faseolina	46
2.2.8 Comportamento Imunológico da Faseolina	50
2.2.9 Padrão de Degradação Enzimática <i>In Vitro</i> da Faseolina	50
2.2.10 Grau de Glicosilação e Conteúdo de Açúcares da Faseolina	55
2.2.11 Extração e Análise Eletroforética das Proteínas Tipo legumina	55
2.2.12 Grau de Glicosilação e Conteúdo de Açúcares das Proteínas Tipo legumina	60
2.3 Discussão	60
2.3.1 Análise da Fração Globulínica	60
2.3.2 Comportamento Imunológico das Globulinas	61
2.3.3 Análise da Fração de Faseolina	61

2.3.4	Composição de Aminoácidos da Faseolina	62
2.3.5	Reação de Degradação Enzimática da Faseolina	63
2.3.6	Grau de Glicosilação e Conteúdo de Carboidratos da Faseolina	64
2.3.7	Separação de Proteínas Tipo legumina e de Vicilinas e Avaliação de suas Faixas de Precipitação	65
2.3.8	Grau de Glicosilação das Proteínas Tipo legumina	66
2.3.9	Aspectos Filogenéticos	67
2.4	Conclusões	69
	Conclusões Gerais	70
	Referências Bibliográficas	71

ABREVIATURAS

IEF	Isoelectric focalization Focalização isoelétrica
HPLC	High performance liquid chromatograph Cromatografia líquida de alta eficiência
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SDS	Sodium dodecyl sulfate Dodecil sulfato de sódio
β -ME	Beta-Mercaptoetanol
TEMED	N,N,N,N'-tetrametil-etilenodiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
FMOC	9-fluorenilmetil cloroformato
OPA	o-ftalaldeído
M.M.	Massa molar em kg/mol
Glx	Ácido glutâmico e glutamina
Asx	Ácido aspártico e asparagina

RESUMO

Sementes de *Phaseolus vulgaris* de 3 cultivares (Aeté-3, Goiano precoce e Carioca) foram analisadas sob diferentes aspectos: concentração das diferentes frações proteicas de albuminas e de globulinas, padrões eletroforéticos, composição de aminoácidos, avaliação do pI das principais vicilinas e seus valores nutritivos. A principal proteína de reserva, a faseolina, ainda, foi analisada em seu grau de glicosilação, conteúdo de carboidratos e padrão de degradação enzimático *in vitro*.

Vários métodos foram utilizados para extração, separação, análise e dosagem das diferentes frações proteicas, tais como, precipitação com tampões, sais e pH diferenciais, diálise, cromatografias (exclusão, afinidade e líquida), eletroforese denaturante, densitometria, reações enzimáticas, colorimétricas e imunológicas.

Aeté e Carioca demonstraram ser cultivares muito semelhantes, pois mostraram o mesmo padrão eletroforético de albuminas e globulinas e a mesma concentração destas proteínas, de lectinas e de leguminas. A faseolina desses cultivares apresentou uma subunidade maior e outras 3 menores na proporção de 5:2:1:2. Apresentaram sementes pequenas, sendo classificados como tipo "Sanilac". Eles são filogeneticamente mais próximos, com características bastante distintas de Goiano. Contudo, o conteúdo de Lys e carboidratos ligados à faseolina foi bem superior em Carioca em relação aos demais cultivares.

Goiano, por sua vez, mostrou um padrão eletroforético bem diferente dos outros cultivares, onde a faseolina era constituída de 2 subunidades maiores e 2 menores, na proporção de 2:2:1:0,1, apresentando sementes grandes, por isso sendo classificado como tipo "Contender". Além disso, diferiu na concentração de lectinas e leguminas. Apresentou um maior conteúdo de carboidratos que Aeté e maior quantidade de Met e Cys que os demais cultivares.

Todas as subunidades da faseolina e as leguminas dos 3 cultivares mostraram ser glicosiladas, embora o grau de glicosilação tenha se distribuído indistintamente.

Quanto à degradação, semelhante também nos 3 cultivares, verificou-se que a faseolina foi prontamente hidrolisada pela tripsina, que agiu na porção central das subunidades, formando polipeptídeos com M.M. ao redor de 20 kg/mol. A subunidade α pareceu ser a primeira a ser quebrada e, em Goiano, ela provavelmente também foi degradada no C-terminal. A faseolina de Goiano foi mais resistente ao ataque pela tripsina do que aquelas de Aeté e Carioca.

Um aspecto comum entre os 3 cultivares, principalmente no que diz respeito à faseolina, foi a verificação da presença de determinantes antigênicos comuns, pois o anticorpo produzido contra a fração de proteínas totais de Goiano reconheceu aquelas de Aeté e Carioca.

Há características que indicam que Goiano seria o cultivar potencialmente mais nutritivo, como o alto conteúdo de aminoácidos sulfurados e de Lys e a menor concentração de compostos hemoaglutinantes.

SUMMARY

Seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Aeté-3, Goiano precoce and Carioca were analysed in different aspects: contents of the different protein fractions of albumins and globulins, electrophoretic banding patterns, amino acid composition, evaluation of the range of precipitation of major vicilins, and their nutritional values. The degree of glycosilation, carbohydrate content and *in vitro* enzymatic hydrolysis patterns were also analysed for faseolin.

Several methods were used for the extraction, separation and analysis of the different protein fractions, e.g. precipitation using buffers; salts and differential pH; dialysis; exclusion, affinity and liquid chromatography; SDS-PAGE; densitometry; enzymatic, colorimetric and immunological reactions.

The cultivars Aeté and Carioca were found to be similar in electrophoretic patterns and contents of albumins, globulins, lectins and legumins. The patterns of faseolin of these cultivars were identical, having one major and three minor bands in a proportion of 5:2:1:2. They presented small seeds and were classified as "Sanilac". They are phylogenetically very similar but unlike Goiano. However, Lys and carbohydrates of faseolin were higher in Carioca than the others.

Goiano showed a very different electrophoretic pattern of faseolin, having two major bands in a proportion of 2:2:1:0,1, with bigger seeds than the others. Goiano had a pattern similar to "Contender". It was also different in lectin and legumin contents. It presented a higher carbohydrate content than Aeté and higher Met and Cys levels than the others.

All subunits of faseolin and the protein like-legumin of Aeté, Goiano and Carioca were glycosylated but the degree of glycosilation was indistinct.

Faseolin of the three cultivars was hydrolysed by trypsin that acts in the central portion of the molecule, producing polypeptides with M.Ws. around 20 kg/mol. The α subunit seemed the first to be degraded and in the case of Goiano, this subunit was hydrolysed at the carboxyl end, too. Faseolin from Goiano was more resistant to proteolytic attack than the others of Aeté and Carioca.

The presence of common antigenic determinants of faseolin between Aeté, Goiano and Carioca was determined.

Some aspects like the high sulfur amino acids and Lys and the low hemoagglutin activity (lectins) suggest that Goiano might have a higher nutritional potencial than Aeté and Carioca.

ERRATA

Na página 21, linha 5, 1º parágrafo, onde se lê 48 e 41, leia 54 e 45.

Na página 27, linha 4, 1º parágrafo, onde se lê 40; 36; 34,5 e 34, leia 42,5; 38,6; 36,7 e 36. Na linha 9, 2º parágrafo, onde se lê 36 e 34,5, leia 38,6 e 36,7. Na linha 12, 3º parágrafo, onde se lê 36; 34,5 e 34 kg/mol, leia 38,6; 36,7 e 36.

Na página 30, linha 15, 2º parágrafo, onde se lê 36 e 34, leia 38,6 e 36,7. Na linha 18, onde se lê 36, leia 38,6 e na linha 19, no lugar de 34,6, leia 36,7.

Na página 40, nas tabelas 5 e 6 respectivamente, onde se verifica a % de globulinas e na % de faseolina, leia:

	AET	GO	CAR
% globulinas	41,2 ^a	53 ^b	45 ^a

	AET		GO		CAR	
	Prot. total	Globulina	Prot. total	Globulina	Prot. total	Globulina
% F	33,25 ^a	80,6 ^a	48,25 ^a	91 ^b	41,46 ^a	92,2 ^b

Na página 42, linha 3, 1º parágrafo, lê-se 37,6; 36,7; 36,7 e 32 no lugar de 36; 34,5; 34,5 e 30.

Na página 45, lado esquerdo da figura 14, onde se lê 48, leia 53.

Na página 46, linhas 9 e 10, 2º parágrafo, onde se lê 46,3; 45,1; 44 e 42,5, leia 53,3; 51,2; 48,7 e 47,4. Nas linhas 11 e 12, onde se lê 48,1; 44,6; 42,4 e 41,3, leia 53,9; 50; 46,2 e 38,6.

Na página 48, figura 16, à esquerda de A, onde se lê 46; 45; 44 e 42,5, leia 53; 51; 48,7 e 47; e à esquerda de G, onde se lê 48; 44,6; 42 e 41, leia 54; 50; 46 e 45.

Na página 50, linha 28, 6º parágrafo, onde se lê 48,5 e 46,6, leia 53 e 50.

Nas páginas 52 e 54, lado direito das figuras 18 e 20, onde se lê 46 e 42,5, leia 53 e 51.

Na página 53, lado direito da figura 19, onde se lê 48 e 42,5, leia 54 e 48.

Na página 57, lado direito da figura 22, onde se lê 46 e 42,5, leia 53 e 50.

Na página 58, lado esquerdo da figura 23, onde se lê 46 e 42,5, leia 53 e 50.

Na página 59, lado direito da figura 24, onde se lê 42,5, leia 50.

Na página 60, linha 5, 1º parágrafo, onde se lê 45 e 35, leia 52 e 37.

Na página 62, linha 5, 1º parágrafo, onde se lê 48 e 41, leia 54 e 45.

Na página 65, linha 23, 3º parágrafo, onde se lê 45, leia 52.

Introdução

O homem obtém seu alimento diretamente das plantas ou de animais alimentados com plantas. Essa alimentação deve prover toda proteína necessária e adequada à idade, ao tamanho e aos diferentes estados fisiológicos em que o organismo humano pode se encontrar.

Sementes de plantas contribuem significativamente para a dieta humana, dentre as quais se destacam dois grupos principais: os cereais e as leguminosas. A produção mundial de grãos de leguminosas é relativamente menor do que a de cereais, embora sua contribuição nutritiva seja comparativamente maior, se analisadas como fonte de energia e proteínas. Enquanto os cereais são responsáveis por 76% (em matéria seca) das principais produções agrícolas, as leguminosas correspondem a 9% deste total [ANTUNES e SGARBIERI, 1980; PAYNE, 1983; LUMEN, 1990].

Sementes de leguminosas constituem uma excelente fonte de proteínas e carboidratos para melhorar dietas à base de cereais e/ou raízes em países de baixa renda econômica, sendo assim extensivamente consumidas na América do Sul e na África [SOUZA e OLIVEIRA, 1969; MA e BLISS, 1978; SGARBIERI *et al*, 1979; SGARBIERI, 1980].

Em média, a concentração de proteínas em cereais corresponde a 10-15% da matéria seca em grãos, enquanto que em leguminosas corresponde a 20-50% das sementes [DERBYSHIRE *et al*, 1976; SGARBIERI *et al*, 1979; BARRAT, 1980; LARKINS, 1981].

A maior fonte de proteínas para o consumo humano e animal provem da reserva destas sementes. Essas proteínas, sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, geralmente são depositadas nos corpúsculos proteicos, e permanecem supercompactadas, de modo que possam se manter inalteradas enquanto a semente está seca ou dormente. Durante as fases iniciais do processo germinativo, essas proteínas são hidrolisadas para fornecer nitrogênio, carbono e outros nutrientes, permitindo o crescimento e o desenvolvimento do embrião. Geralmente, são proteínas ricas em aspartato, glutamato, leucina, aminoácidos básicos e amidas, podendo se associar a açúcares ou outros compostos [MAXIMOV, 1938; BOULTER e DERBYSHIRE, 1971; DERBYSHIRE *et al*, 1976; BOLLINI e CHRISPEELS, 1978; PERNOLLET e MOSSÉ, 1983].

Apesar do alto conteúdo protéico, as sementes de leguminosas raramente são ingeridas cruas, pois as proteínas são responsáveis por certo grau de toxicidade e/ou digestibilidade deficiente [ROMERO *et al*, 1975; PUSZTAI e PALMER, 1977; PUSZTAI *et al*, 1979; SGARBIERI *et al*, 1979; STEGEMANN e PIETSCH, 1983; SGARBIERI e GARRUTI, 1986; DESHPANDE e NIELSEN, 1987a, 1987b]. Nas últimas décadas, consideráveis esforços têm sido feitos para melhorar o valor nutritivo dessas sementes, em reconhecimento à sua importância como excelentes fontes de proteínas.

Muitos métodos são utilizados para extrair, separar, isolar e purificar essas proteínas, e a eficiência dos mesmos pode ser verificada mediante a análise de uma propriedade distinta do composto que interessa separar [STRYER, 1982]. Dentre os mais comuns e os mais simples, destacam-se aqueles baseados na solubilidade, que envolvem sais, tampões e pH diferentes.

A preparação de amostras de proteínas quimicamente puras é um ponto crucial em trabalhos científicos que visem à caracterização destes componentes celulares [SCHOLZ *et al.*, 1974].

O princípio do processo de solubilidade de OSBORN e CAMPBELL (1896) [apud PERNOLLET e MOSSÉ, 1983] pode ser amplamente utilizado para extração de praticamente toda proteína de reserva de leguminosas e cereais.

Para purificar e caracterizar estas proteínas, após extração, geralmente prossegue-se com a utilização de técnicas cromatográficas, eletroforéticas, reações de imunodifusão e a análise de aminoácidos [FRAME *et al*, 1976; BIETZ, 1979; JERMYN, 1975; OSBORN *et al*, 1987; CHRISTIE e PALMER, 1990; DOUCET *et al*, 1990; KAWASAKI e SUZUKI, 1990; ORTEGA *et al*, 1990; TAKAHASHI e HIROSE, 1990].

Porém, somente técnicas combinadas que empregam as diferenças nos vários parâmetros físico-químicos das proteínas poderão ser úteis para caracterização e isolamento das mesmas.

O problema do processamento de alimentos proteicos tem muitos aspectos, tanto tecnológicos como agrícolas. Mas o mais importante é o melhoramento da qualidade nutricional de proteínas de sementes através de seleção e métodos genéticos, bem como o controle das propriedades funcionais das proteínas de reserva, a fim de se obterem produtos com a qualidade apropriada para o consumo.

A solução desses problemas reside na investigação de propriedades físico-químicas dessas proteínas, separando-as e estudando suas frações individualmente. Desse modo, poder-se-á compreender melhor como e onde são formadas, quais são suas funções no endosperma, suas estruturas e características, tanto em nível celular quanto molecular, tanto de várias espécies como de vários cultivares de leguminosas como, por exemplo, os feijões. Além disso, proporciona investigações relacionadas à taxonomia e a estudos evolutivos [BOULTER e DERBYSHIRE, 1971; DUDMAN e MILLERD, 1975; MA e BLISS, 1978; BIETZ, 1979; SAKAKIBARA *et al*, 1979;

STEGEMANN e PIETSCH, 1983; GRINBERG *et al*, 1989; FARFÁN, 1990].

Num mundo onde milhões de pessoas são seriamente subnutridas, há necessidade de se melhorarem e selecionarem plantas com maior e melhor conteúdo nutricional.

O Feijão

O feijão é a semente mais consumida no mundo, apesar de não ter um dos mais altos conteúdos proteicos como a soja (~51%), o tremoço (~45%) e o guar (~33%) [SGARBIERI *et al*, 1979; SGARBIERI, 1980; SGARBIERI e GARRUTI, 1986; AHN *et al*, 1990].

Sementes de leguminosas possuem bastante lisina (~6,5%) em suas proteínas e pouca metionina e cisteína (~2,5%) enquanto os cereais, ao contrário, mostram pouca lisina (~3%) e um alto conteúdo de metionina e cisteína (~4,5%) e portanto, são complementares um ao outro do ponto de vista nutricional¹. Logo, o homem aproveita melhor as proteínas quando leguminosas e cereais são ingeridos juntos, como, por exemplo, arroz e feijão, que é o que constitui a base da alimentação no Brasil [SOUZA e OLIVEIRA, 1969; SGARBIERI *et al*, 1979; LUMEN, 1990].

O feijão fornece aproximadamente 28% de proteínas, 1-3% de gorduras, 60-65% de carboidratos (amido), muitas vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina e ácido fólico), e íons (ferro, cobre, magnésio, zinco e potássio). Por outro lado, contém fatores antinutricionais e tóxicos como ácido fítico, tanino, fenóis, saponinas, lectinas, inibidores de tripsina e quimotripsina e de alfa-amilase, cujos efeitos podem ser reduzidos ou suprimidos com embebição em água seguida do cozimento, já que são termolábeis [PALMER *et al*, 1973; LIENER, 1976; ROMERO e RYAN, 1978; ANTUNES e SGARBIERI, 1980; SGARBIERI, 1980; SGARBIERI e GARRUTI, 1986; DESHPANDE e NIELSEN, 1987b; ALMEIDA *et al*, 1991].

Embora os feijões sejam ricos em alguns aminoácidos essenciais, como lisina, treonina, valina, isoleucina e leucina, apresentam, além de uma deficiência em metionina e cisteína, uma baixa biodisponibilidade dos mesmos [LIENER, 1976; MA e BLISS, 1978; SGARBIERI, 1980; SGARBIERI e GARRUTI, 1986].

Origem e Evolução do Feijão

Estudos arqueológicos com carbono radioativo indicam que o feijão teria se originado numa área que compreende desde o norte da América do Sul até o sul dos Estados Unidos, se desenvolvendo principalmente na região de cultura Inca [SGARBIERI e GARRUTI, 1986]. Desse modo, ele poderia ter sido domesticado

¹O padrão da F.A.O. (1971) para lisina é 5,5% e para metionina e cisteína é 3,5%. São concentrações ideais de aminoácidos numa proteína alimentar humana.

no México e levado para a América do Sul ou domesticado neste mesmo local sem, entretanto, se excluir a América Central. Muitos sugerem a domesticação independente nos 2 lugares.

EVANS, em 1976, sugeriu a existência de 2 centros de domesticação, um na América Central originando cultivares com sementes pequenas e outro nos Andes, que deu origem aos genótipos que apresentam sementes relativamente grandes. Os feijões cultivados da América Central apresentam maior variabilidade do que os selvagens existentes nos Andes. Embora apresentando padrões até certo ponto distintos, os cultivares da América Central e da região dos Andes teriam se originado a partir de um ancestral comum. [GEPTS *et al.*, 1986].

Os cultivares provavelmente surgiram de domesticações múltiplas ao longo da área de distinção geográfica dos feijões selvagens, e essa domesticação induziu uma redução na diversidade da principal proteína de reserva do feijão (diminuição do número de variantes dentro de um padrão), especialmente na Meso-América [KOENIG *et al.*, 1990].

Atualmente, a exata identificação de um cultivar é muito importante já que diz respeito ao plantio correto, às considerações financeiras em relação ao preço do grão, aos cumprimentos da legislação, à correta identificação da semente antes do plantio, etc [VAUGHAN, 1983].

A variabilidade das proteínas de semente têm sido extensivamente usadas em muitas produções para detectar padrões e níveis de diversidade genética dentro de uma espécie [LADIZINSKY, 1983; LOVELESS e HAMRICK, 1984 apud KOENIG *et al.*, 1990], sendo amplamente utilizadas no controle de qualidade e em estudos taxonômicos e filogenéticos. Nesses casos, existem várias razões para o uso de proteínas de sementes, pois estas podem ser consideradas como um estado fisiológico estável, uma unidade "conservativa", pois são pouco afetadas pelo ambiente, pela origem geográfica, pelas flutuações sazonais e pelas mutações espontâneas [LADIZINSKI e HYMOWITZ, 1979 apud VAUGHAN, 1983].

Proteínas do Feijão

Como todas as leguminosas, o feijão apresenta 2 principais grupos de proteínas: as albuminas e as globulinas, assim denominadas de acordo com os critérios de solubilidade estabelecidos por OSBORN e CAMPBELL (1896) [apud PERNOLLET e MOSSÉ, 1983][BOULTER e DERBYSHIRE, 1971; CROCOMO, 1975; ROMERO *et al.*, 1975; MA e BLISS, 1978]. OSBORN e CAMPBELL (1896) também distinguiram outros 2 grupos proteicos, glutelinas e prolaminas, presentes principalmente em cereais.

Prolaminas e Glutelinas

As prolaminas são proteínas geralmente solúveis em soluções alcoólicas (70-80%) e insolúveis em água ou álcool puro [FARFÁN, 1990]. São pouco estudadas em feijão pois são encontradas em baixas concentrações nessas sementes (menos que 1%).

As glutelinas são solúveis em soluções alcalinas ou ácidas muito diluídas e insolúveis em solventes neutros e constituem uma fração proteica bastante heterogênea. Junto com as prolaminas constituem as principais proteínas de reserva de cereais [PAYNE, 1983].

Albuminas

As albuminas são solúveis em água e geralmente são proteínas enzimáticas, não demonstrando ser glicosiladas. Nessas proteínas constata-se uma grande abundância de aminoácidos essenciais como metionina, cisteína e lisina, e verifica-se a presença de lectinas, tornando a fração albumínica importante do ponto de vista nutricional [MA e BLISS, 1978].

Globulinas

Do total de proteínas da semente crua, 50 a 80% correspondem às globulinas [ROMERO *et al*, 1975; SGARBIERI e GARRUTI, 1986].

As globulinas são insolúveis em água e solúveis em soluções salinas. Elas constituem as principais proteínas de reserva das sementes de leguminosas [PAYNE, 1983].

OSBORN e CAMPBELL (1896) [apud PERNOLLET e MOSSÉ, 1983] propuseram ainda a existência de dois tipos de globulina, encontrados em ervilha: as leguminas (11S) e as vicilinas (7S). Este conceito foi estendido a várias leguminosas por DANIELSON (1949) [apud DANIELSON, 1956; PERNOLLET e MOSSÉ, 1983]. Em 1976, DERBYSHIRE *et al* publicaram dados e argumentos que tornaram essa divisão praticamente inquestionável. A tabela 1 mostra as principais diferenças entre os dois grupos de globulina.

As leguminas são proteínas que apresentam uma molécula maior e mais resistente ao calor, além de apresentarem maiores concentrações de aminoácidos sulfurados do que as vicilinas. Entretanto, as vicilinas são as principais proteínas de reserva de *Phaseolus vulgaris*. As leguminas representam a menor porção proteica e em alguns casos podem até estar ausentes [SCHOLZ *et al*, 1974; DERBYSHIRE e BOULTER, 1976; DERBYSHIRE *et al*, 1976; BOLLINI e CHRISPEELS, 1978; SAKAKIBARA *et al*, 1979]. Leguminas e vicilinas estão localizadas nos corpúsculos proteicos e juntas perfazem ao redor de 80% do nitrogênio proteico das sementes de leguminosas [BARKER *et al*, 1976; DERBYSHIRE *et al*, 1976].

Tabela 1: Principais diferenças entre leguminas e vicilinas

CARACTERÍSTICA	LEGUMINA	VICILINA
C.S. ^a	11S	7S
M.M.	300-400 kg/mol	200 ± 50 kg/mol
Em sol. salina	menos solúvel	mais solúvel
T ^b de coagulação	alta (mais estável)	baixa (menos estável)
Quantidade de S e N ^c	alta	baixa
Aminoácidos	mais sulfurados	menos sulfurados
Glicosilação	geralmente não tem açúcares	glicoproteína (lig. covalente)

^aCoeficiente de sedimentação

^bTemperatura

^cS=enxofre e N=nitrogênio

Essas proteínas mostram um alto conteúdo de amidas, bastante lisina e pouco triptofano, e a solubilidade das mesmas depende da força iônica e do pH [SUN e HALL, 1975; SHEIN, 1990]. Leguminas e vicilinas podem ser separadas por precipitação isoelétrica e também por diferença de solubilidade em soluções salinas. As leguminas são mais solúveis em soluções salinas concentradas ao passo que as vicilinas o são em soluções salinas menos concentradas [ROMERO *et al*, 1975; SUN e HALL, 1975; SUCHKOV *et al*, 1990].

Leguminas

As leguminas são proteínas oligoméricas globulares, com muitas partes iguais na cadeia polipeptídica, levando a uma considerável homologia de até 60%, e seu pI está em torno de 4,8. Em relação à estrutura terciária, são hexâmeros que não têm estrutura compacta, e são constituídas por 2 tipos de cadeia: as α e as β . As α são ácidas, variando de 27 a 50 kg/mol, são as mais pesadas e os aminoácidos N-terminais são leucina e glutamato. As β são básicas, com 19 a 24 kg/mol, mais leves e os aminoácidos N-terminais são glicina, alanina, valina e leucina. As cadeias se unem geralmente através de pontes dissulfeto, em quantidades equimolares. Elas se ligam num bicatenário, formando um monômero. Seis monômeros se ligam e formam 2 hexágonos idênticos, um sobre o outro, e uma cadeia ácida tem como vizinhas 3 básicas (figura 1) [WRIGHT e BOULTER, 1974; DERBYSHIRE *et al*, 1976; PRZYBYLSKA *et al*, 1979; BLAGROVE *et al*, 1980; HORSTMANN, 1983; GRINBERG *et al*, 1989].

Em SDS-PAGE, geralmente, mostram 3 bandas, cujas M.M. podem variar de espécie para espécie. Em *Phaseolus aureus*, as bandas apresentam 56, 44 e 16,5 kg/mol [ERICSON e CHRISPEELS, 1973], em *Pisum sativum*, 40, 39 e 24 kg/mol

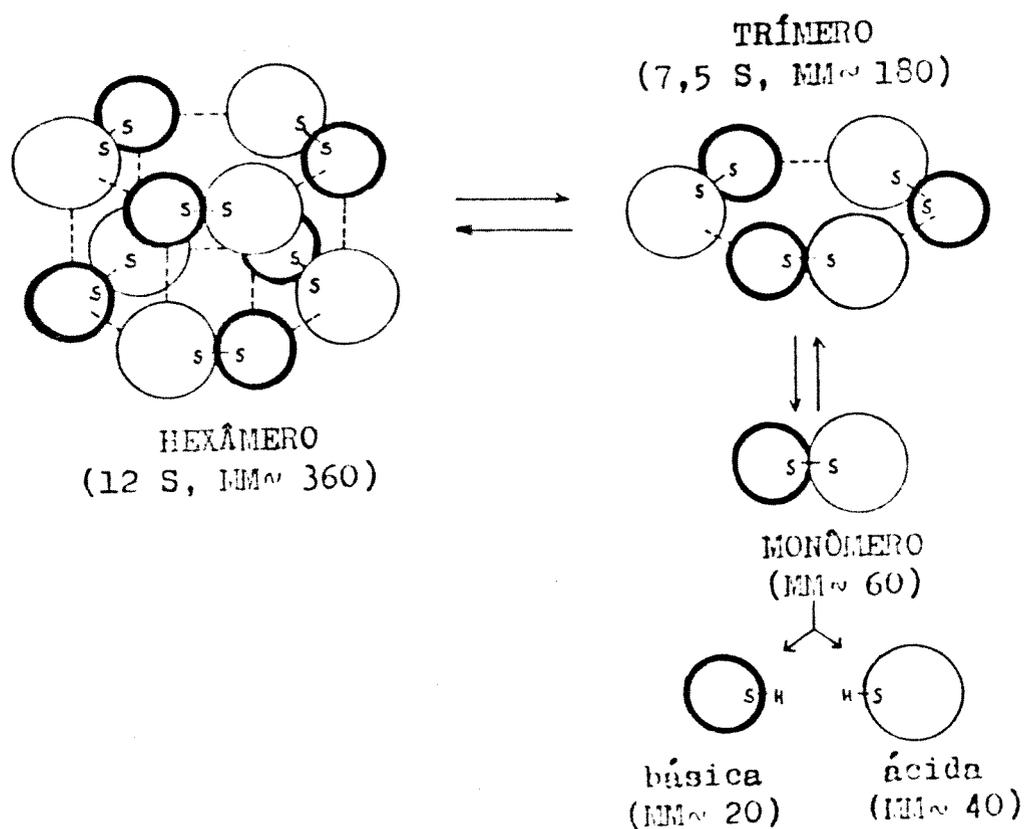


Figura 1: Modelo esquemático da estrutura quaternária da legumina. Linhas pontilhadas, ligações não-covalentes; S-S, pontes dissulfídicas.

[BLAGROVE *et al.*, 1980] e em *Vicia faba*, 35,5, 23 e 19 kg/mol [PASQUALINI *et al.*, 1991].

Além disso, mostram um alto conteúdo de arginina, aspartato e glutamato e baixo conteúdo de metionina e cisteína, e menos de 1% de açúcares neutros [DERBYSHIRE *et al.*, 1976].

Essas proteínas podem sofrer dissociação ($11S \rightarrow 7S \rightarrow 3S \rightarrow 2S$, subunidades ácidas e básicas) [DERBYSHIRE *et al.*, 1976]. A reassociação é possível entre todas as subunidades, entre parte delas, entre subunidades de espécies diferentes e até mesmo por hibridização com subunidades de globulinas de outras famílias, demonstrando a macro-heterogeneidade que pode existir nessas proteínas [PERNOLLET e MOSSÉ, 1983]. A força iônica e o pH têm grande influência na associação e dissociação das subunidades [MORI e UTSUMI, 1979; BLAGROVE *et al.*, 1980]. Por exemplo, conglutina de tremço possui 2 formas oligoméricas, que indicam um equilíbrio de associação-dissociação dependente desses 2 fatores [ESNAULT *et al.*, 1991]. Já no caso de glicinina, esses fatores exercem ainda, um grande efeito na desnaturação ácida e agregação da amostra [DERBYSHIRE *et al.*, 1976; BLAGROVE *et al.*, 1980; SHEIN, 1990].

Vicilinas

As vicilinas são glicoproteínas formadas por 3 a 4 subunidades diferentes com ~ 60% de homologia, com $pI \sim 5,5$ e geralmente não são ligadas por pontes dissulfeto. Num primeiro passo formam-se os heterotrímeros, seguido da conversão para uma estrutura mais estável com a formação de supertetrâmeros (com 4 trímeros). Embora isso ainda não esteja bem estabelecido, há a possibilidade de formação de trímeros e desse modo a M.M. da proteína nativa diminui de 200 para 150 kg/mol [BOLLINI e CHRISPEELS, 1978; PERNOLLET e MOSSÉ, 1983].

O processo de glicosilação ocorre concomitantemente ao processo de tradução da proteína [HURKMAN e BEEVERS, 1980; PERNOLLET e MOSSÉ, 1983] e os açúcares ligados às vicilinas em sementes de feijão podem ser glucosamina, hexosamina, manose, pentose e glicose [RACUSEN e FOOTE, 1971].

O pH e a força iônica têm grande influência na dissociação e associação dessas proteínas ($19S \rightarrow 18S \rightarrow 7S \rightarrow 3S \rightarrow 2S$) [DANIELSON, 1956; DERBYSHIRE *et al.*, 1976]. A solubilidade das vicilinas depende ainda da temperatura, uma outra propriedade dessas proteínas utilizada para separá-las, pois precipitam em baixas temperaturas. Em soluções de NaCl 0,05M a 0°C, por exemplo, formam um precipitado branco que desaparece se a solução for de NaCl 0,5M e a temperatura elevada [SAKAKIBARA *et al.*, 1979].

Elas podem ser heterogêneas e variar bastante de espécie para espécie. As vicilinas de *Phaseolus vulgaris* são codificadas por 2 famílias de genes com 7 a 9 membros [ERICSON e CHRISPEELS, 1973].

Em *Phaseolus vulgaris*, a principal proteína de reserva é uma vicilina, denominada faseolina (glicoproteína II).

Faseolina

A faseolina compreende de 50 a 60% da proteína total da semente quando madura e até 75% da globulina total [ROMERO *et al*, 1975; BARKER *et al*, 1976; MA e BLISS, 1978]. Sua M.M. é de aproximadamente 150 kg/mol, apresentando de 3 a 4 subunidades que variam de 52 a 43 kg/mol, e sua forma principal é a estrutura β -pregueada [DESHPANDE e DAMODARAN, 1989; CHAMBERS *et al*, 1990]. Dependendo do pH, dissocia-se reversivelmente em tetrâmeros (18.2S a pH~3,8), protômeros (7,1S a pH~7) e polipeptídeos (3S a pH~12) [McLEESTER *et al*, 1973; ROMERO *et al*, 1975; HALL *et al*, 1977]. A faseolina é uma glicoproteína, contendo manose, glucosamina e açúcares neutros, podendo ter de 3 a 6% de açúcares. Contém cerca de 37,6 % de resíduos amídicos e ácidos e ao redor de 1% de resíduos com enxofre [ERICSON e CHRISPPEELS, 1973; ERSLAND *et al*, 1983; BERNARDI *et al*, 1991]. Um certo grau de heterogeneidade dessa proteína na semente madura pode ser devido ao processo de glicosilação, e por isso pode se tornar difusa em SDS-PAGE [ERICSON e CHRISPPEELS, 1973; LIOI e BOLLINI, 1984 apud LIOI, 1989].

- Aspectos genéticos

É provável que, para codificar a faseolina, existam pelo menos 14 genes com pequenas diferenças nas suas seqüências de bases. O grau de variabilidade encontrado para a faseolina é consideravelmente menor do que o de cereais, onde a variação das proteínas tem sido usada para identificar cultivares [BROWN *et al.*, 1981a].

As faseolinas são uma família de proteínas cuja composição polipeptídica apresenta heterogeneidade de carga e/ou tamanho molecular [BOLLINI e VITALE, 1981]. Os genes codificadores de faseolina estão localizados muito próximos no cromossomo e têm segregação mendeliana [ROMERO *et al.*, 1975]. Isso leva a crer que provavelmente se originaram de um ancestral comum que, ao longo da evolução, foi sendo submetido a processos de mutações, tais como deleções internas e/ou duplicações, dando origem, assim, aos 3 principais padrões eletroforéticos mais conhecidos na literatura [HALL *et al*, 1977; TALBOT *et al*, 1984 apud LIOI, 1989]: "Tendergreen" (T), "Sanilac" (S) e "Contender" (C), identificados por BROWN *et al* (1981a) (figura 2). Posteriormente, BOLLINI e VITALE (1981), GEPTS e BLISS (1986), GEPTS *et al* (1986), LIOI (1989) e KOENIG *et al* (1990) verificaram a presença de novos padrões de faseolina, classificados como "Bonello" (B), "Middle America" (M), "Huevo de huanchaco" (H), "Ayacucho" (A), "Inca" (I) e "Jujuy" (J).

O padrão Tendergreen, com sementes grandes, predomina na região dos Andes. Ele se caracteriza por apresentar, em SDS-PAGE, 3 bandas maiores e uma menor:

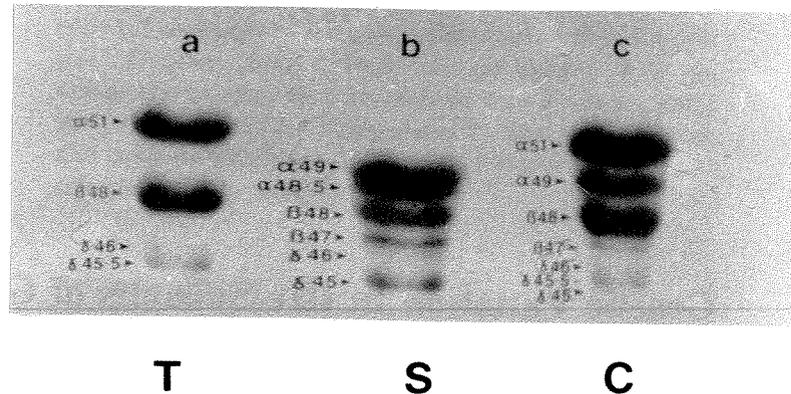


Figura 2: SDS-PAGE de faseolina de *Phaseolus vulgaris* dos padrões "Tendergreen" (T), "Sanilac" (S) e "Contender" (C). 40 μ g de faseolina, adaptado de BROWN *et al.*, 1981a.

$\alpha \sim 51$ kg/mol, $\beta \sim 48$ kg/mol e γ , ~ 46 e 45,5 kg/mol [BROWN *et al.*, 1981a; LIOI, 1989]. Outros autores encontraram, para as mesmas, valores que variaram de 53 a 43 kg/mol [HALL *et al.*, 1977; BROWN *et al.*, 1980]. Aquela que apresenta menor grau de glicosilação é a subunidade γ . A análise bidimensional (IEF x SDS) mostra 4 subunidades maiores e uma menor.

O padrão Sanilac, com sementes pequenas, predomina na América Central. Ele apresenta 5 bandas maiores e uma menor: as maiores de, ~ 49 e 48,5 kg/mol foram denominadas de α , as 2 seguintes, com ~ 48 e 47 kg/mol, denominadas de β e as 2 menores, de ~ 46 e 45 kg/mol, como γ . Em análise bidimensional (SDS x IEF), mostra 7 subunidades maiores e uma menor.

O padrão Contender exhibe bandas comuns ao Sanilac e ao Tendergreen, pois é resultante do cruzamento de ambos, apresentando sementes maiores que as de Sanilac [GEPTS *et al.*, 1986, LIOI, 1989]. Assim, são encontradas 6 bandas maiores e uma menor: as 2 maiores, de ~ 51 e 49 kg/mol, foram denominadas de α , as outras 2 de β , com ~ 48 e 47 kg/mol e as menores, de ~ 46 , 45,5 e 45 kg/mol, como γ . Em análise bidimensional (SDS x IEF), mostra 7 subunidades maiores e uma menor, como em Sanilac.

- Degradabilidade da Faseolina e Fatores Antinutricionais

As proteínas de *Phaseolus vulgaris* podem ser submetidas à degradação por fungos, bactérias, proteases nos cotilédones em germinação, no intestino dos insetos ou no sistema digestivo humano.

Apesar de o feijão ser o principal alimento proteico de muitos países, seu valor nutritivo é limitado devido não somente ao baixo teor de aminoácidos essenciais, como também à baixa biodisponibilidade dos mesmos [AHN *et al.*, 1990].

Uma razão importante para essa baixa disponibilidade biológica é a baixa susceptibilidade das proteínas (faseolina) à proteólise *in vivo*. A principal proteína de vários cultivares de feijão é relativamente resistente também à hidrólise em sistemas *in vitro* [AHN *et al.*, 1990].

A digestibilidade da principal proteína de reserva de feijão é muito baixa (52-69%) quando comparada com outras sementes de leguminosas (varia de 80-90%) [SGARBIERI *et al.*, 1979] e quando nativa apresenta menor digestibilidade do que quando aquecida.

Várias teorias foram propostas para tentar explicar essa resistência da faseolina à proteólise [ROMERO e RYAN, 1978; SGARBIERI *et al.*, 1979; DESHPANDE e NIELSEN, 1987a; DESHPANDE e NIELSEN, 1987b; WU e WHITAKER, 1990]. Elas incluem a restrição estrutural e a estrutura compacta; a estabilidade dada pela sua estrutura tridimensional pelo meio de carboidratos, que constitui um obstáculo estérico para as proteinases, e a interação com taninos e compostos fenólicos ou outros compostos celulares dos tecidos, formando complexos pouco digeríveis, além da presença dos inibidores de proteases.

Lectinas

Um outro grupo de proteínas, localizado nos corpos proteicos, também considerados como proteínas de reserva, são as lectinas [BOLLINI e CHRISPPEELS, 1978].

Essas proteínas são também conhecidas como fitohemoaglutininas, devido à propriedade de aglutinarem células, principalmente os eritrócitos, o que confere a elas uma natureza tóxica e antinutricional, contribuindo para a baixa digestibilidade da faseolina e de outras proteínas do feijão, e conseqüentemente para o pobre valor nutritivo da semente. Correspondem a cerca de 10% do total de proteínas e ao redor de 2% do peso seco da semente [McLEESTER *et al.*, 1973; DERBYSHIRE *et al.*, 1976; PUSZTAI *et al.*, 1979; MEJIA *et al.*, 1990]. Em contraste à principal proteína de reserva de feijão, uma globulina, as lectinas estão distribuídas tanto na fração de albuminas quanto na de globulinas [MANEN e MIÈGE, 1977].

As lectinas, 6,4S, mostram 2 subunidades (~ 34 e 35 kg/mol) na proporção de 3:1 com pI variando de 4,5 a 6,9 [PUSZTAI e WATT, 1974; BERNARDI *et al.*, 1990]. A subunidade mais leve também denominada de L, aglutina leucócitos e é predominantemente albumina. A outra mais pesada é a E que aglutina eritrócitos e é predominantemente tipo globulina. São diferenças no N-terminal que promovem diferenças na atividade de aglutinação. Elas podem se apresentar em 5 formas tetraméricas (isolectinas) (figura 3). No tetrâmero, as lectinas constituídas somente com subunidades L ou somente com subunidades E, aglutinam ou só leucócitos ou

só eritrócitos respectivamente e não apresentam atividade mitogênica. As formas híbridas, com subunidades L e E, aglutinam leucócitos e eritrócitos e mostram atividade mitogênica [MANEN e MIEGE, 1977; BOLLINI e CHRISPEELS, 1978; BROWN *et al*, 1981b; PUSZTAI *et al*, 1983; SHARON e LIS, 1990].

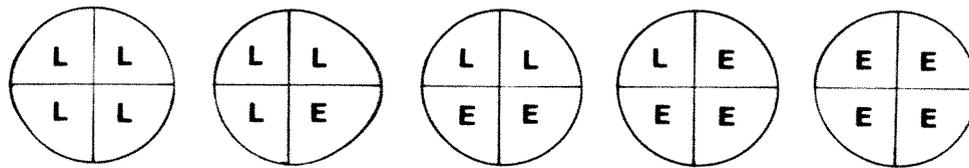


Figura 3: Modelo esquemático da estrutura quaternária das 5 formas tetraméricas de isolectinas de *Phaseolus vulgaris* L. L=subunidade L, E=subunidade E.

As lectinas do feijão e de outras leguminosas são glicoproteínas que contêm glucosamina e manose, e podem se ligar a açúcares específicos, propriedade que permite a separação das mesmas por cromatografia de afinidade. Entretanto, para que essa propriedade se manifeste, são necessários íons como Mg^{2+} e Ca^{2+} e a ligação, então, se estabiliza através de pontes de H^+ . Em *Phaseolus vulgaris*, essas proteínas interagem com oligossacarídeos, podendo se unir também a compostos hidrofóbicos como os fitohormônios. BERNARDI *et al*, 1990; SHARON e LIS, 1990]. Sua estrutura principal é a β pregueada e ocorre ausência de α hélice [PUSZTAI e WATT, 1974].

As lectinas são relativamente termolábeis e, portanto, podem ser denaturadas durante o processo de cozimento do feijão. Quando ingerida sob a forma nativa (não inativada), pode provocar, em ratos, perda de peso, inibição do crescimento, interferência na absorção e retenção de nitrogênio, destruição das microvilosidades dos intestinos, formação de complexos não digeríveis com componentes celulares, podendo levar até a morte do animal [PUSZTAI e PALMER, 1977; PUSZTAI *et al*, 1979; BROWN *et al*, 1982].

Embora não se saiba com certeza qual o papel dessas proteínas nas plantas, dentre as diversas funções atribuídas às lectinas [PUSZTAI e WATT, 1974; PUSZTAI *et al*, 1983; SHARON e LIS, 1990]. podem-se citar as seguintes:

- transporte e armazenamento de açúcares;

- controle do crescimento, pois estão em diferentes partes da planta, podendo se ligar a fitohormônios, e atuar na extensão celular;
- proteção contra herbívoros e fungos patogênicos;
- mediadores de simbiose - devido à sua propriedade típica de se ligarem à açúcares específicos, atuam como intermediários na simbiose entre os microorganismos fixadores de N e as raízes de leguminosas. Esse processo envolve aspectos ligados ao reconhecimento celular, uma característica que vem sendo utilizada pela medicina no controle de tumores malignos;
- proteína de reserva - tem-se observado também que as lectinas, ainda que tardiamente, são metabolizadas durante a germinação, o que faz com que muitos autores a considerem como uma proteína de reserva.

OBJETIVOS

Todas as proteínas aqui tratadas demonstram ter um papel importante para a semente e para o ser humano na medida em que determinam seu valor nutritivo e sua qualidade para o consumo. No Brasil, existem muitos cultivares de feijão sendo introduzidos no mercado. Um grande potencial genético existe em todos esses cultivares para se promoverem cruzamentos e o melhoramento nutricional dos mesmos. Porém, para isso é preciso conhecer cada um deles tanto em nível celular como intramolecular.

Neste trabalho foram utilizados 3 cultivares nacionais de feijão (*Phaseolus vulgaris*), Aeté-3, Goiano precoce e Carioca (figura 4), cedidos pela Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Aeté-3 (AET) é um cultivar que pertence ao grupo Bico de ouro, com sementes cor creme e halo alaranjado. Goiano precoce (GO) pertence ao grupo Manteiga, com sementes mais arredondadas e também de cor creme. Carioca (CAR) não pertence a um grupo específico, pois apresenta sementes com mais de uma cor e é rajado. Desse modo, este trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Avaliar e testar vários métodos para extrair, separar e purificar as albuminas e globulinas de sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*.
2. Identificar e caracterizar parcialmente do ponto de vista físico-químico e bioquímico, as frações de albumina e globulina de sementes dos 3 cultivares nacionais de *Phaseolus vulgaris*.
3. Avaliar a degradabilidade *in vitro* da faseolina quimicamente pura, através de endopeptidase do sistema gastro-intestinal de animais.

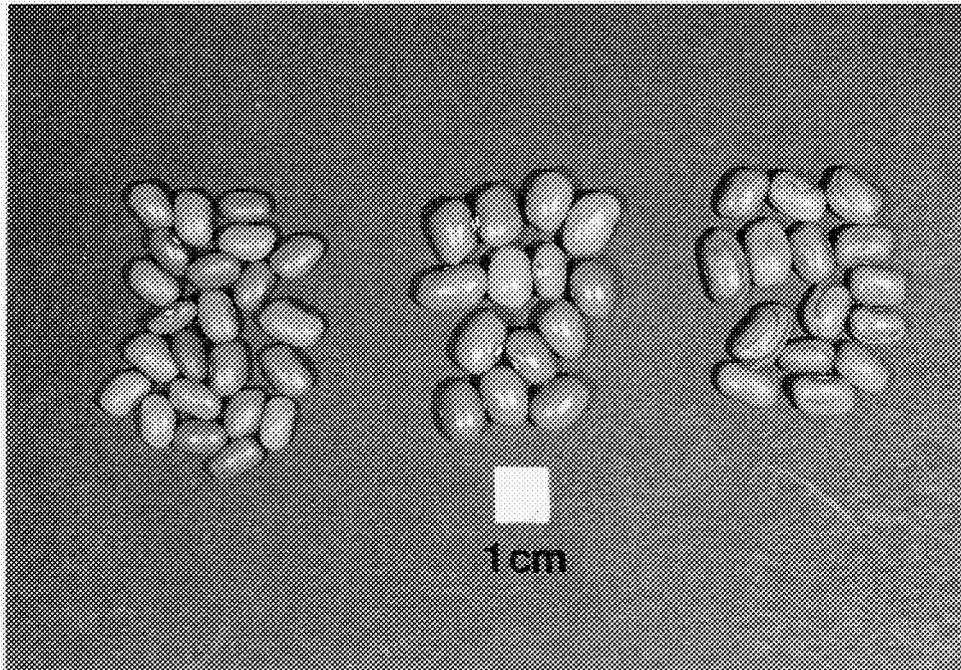


Figura 4: Sementes de *Phaseolus vulgaris* dos cultivares Acté-3, Goiano precoce e Carioca, respectivamente (da direita para a esquerda), cedidos pelo Instituto Agrônômico de Campinas.

Metodologia Geral

Os métodos apresentados nesse item são aqueles realizados indistintamente para o estudo das diferentes frações proteicas. Métodos específicos serão tratados nos capítulos correspondentes.

Preparo do Material Vegetal

Sementes com 3-6% de umidade tiveram as cascas retiradas, e os cotilédones foram moídos em moinho de bola por cinco minutos. A farinha obtida foi passada duas vezes em peneira com malha de 0,185 mm.

Essa farinha foi desengordurada com hexano, sob agitação, durante uma noite. Em seguida foi lavada com éter e seca ao ar, sendo armazenada em frascos hermeticamente fechados e conservados em local de baixa umidade à temperatura ambiente. Esse material foi utilizado em todas as investigações bioquímicas.

Extração das Proteínas

A extração das diferentes frações proteicas foi realizada através de técnicas estabelecidas que envolvem solubilização e/ou precipitação diferencial dessas frações em tampões com pH e forças iônicas apropriadas, baseada na metodologia descrita por OSBORN e CAMPBELL (1896), adaptada de SANTORO (1988) (figura 5).

Proteínas totais foram extraídas em tampão borato e/ou fosfato de sódio contendo NaCl, em pH que variaram de 7,5 a 8. As albuminas e globulinas foram obtidas através de diálise contra água destilada e/ou tampão acetato de sódio. As diálises foram realizadas entre 5-10°C, durante pelo menos 48h, ou até a obtenção de um precipitado branco (globulinas).

Utilizando-se as suas propriedades físico-químicas, as globulinas, as leguminas e as vicilinas foram separadas pela diferença de solubilidade em soluções salinas e precipitação diferencial em função dos seus pI.

As frações obtidas foram imediatamente submetidas a eletroforese em meio denaturante, com o objetivo de se monitorar a pureza das mesmas.

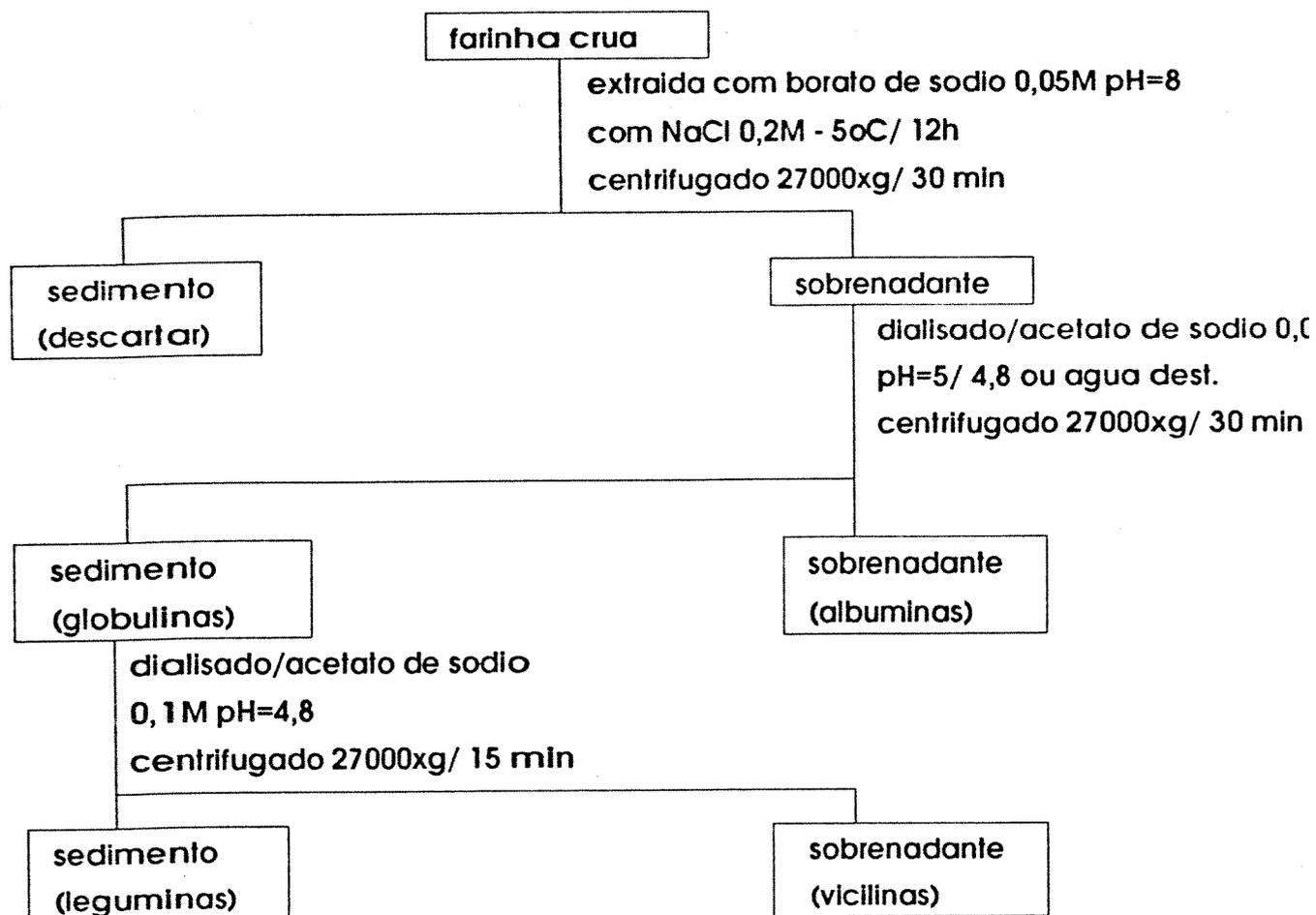


Figura 5: Obtenção das diferentes frações proteicas de sementes de *Phaseolus vulgaris*, adaptado de SANTORO (1988).

Dosagem de Proteínas

As proteínas totais foram extraídas a partir de farinha com NaOH 0,2%. A fração solúvel proveniente da centrifugação, bem como outras frações proteicas, foram dosadas de acordo com BRADFORD (1976), utilizando-se BSA (bovine serum albumin, albumina de soro bovino-Sigma) ou globulina purificada como padrão, dentro de um intervalo de 10-100 μ g de proteína padrão. Os resultados foram obtidos através de equação de regressão.

Todos os dados apresentados neste trabalho foram resultantes de pelo menos 3 repetições.

Eletroforese

Todas as eletroforeses foram realizadas em equipamento construído em acrílico no Departamento de Fisiologia Vegetal-UNICAMP, adaptação do modelo 2001 (14x16) da LKB (Pharmacia) (figura 6).

Foi utilizado o sistema descontínuo em meio denaturante (contendo SDS), por adaptação do método descrito por LAEMMLI (1970), com concentrações de poliacrilamida de 13 e 15%.

As soluções estoque utilizadas na preparação dos géis foram as seguintes:

- Solução A: 34g de acrilamida e 0,3g de bis-acrilamida em 100 ml de água destilada;
- Solução B: 7,5g de acrilamida e 0,11g de bis-acrilamida em 25 ml de água destilada;
- Tampão do gel de resolução: Tris-HCl 1M pH=8,8;
- Tampão do gel de empacotamento: Tris-HCl 1M pH=6,8;
- Solução de SDS 10%;
- TEMED.

Os géis de resolução foram preparados em placas verticais, utilizando-se os seguintes volumes das soluções estoque:

SOLUÇÃO	VOLUME (ml)	
	13%	15%
tampão de resolução	4,8	4,8
água destilada	2,7	2,0
solução A	4,8	5,5
solução de SDS 10%	0,15	0,15
TEMED	0,05	0,05
persulfato de amônio 10%	0,05	0,05

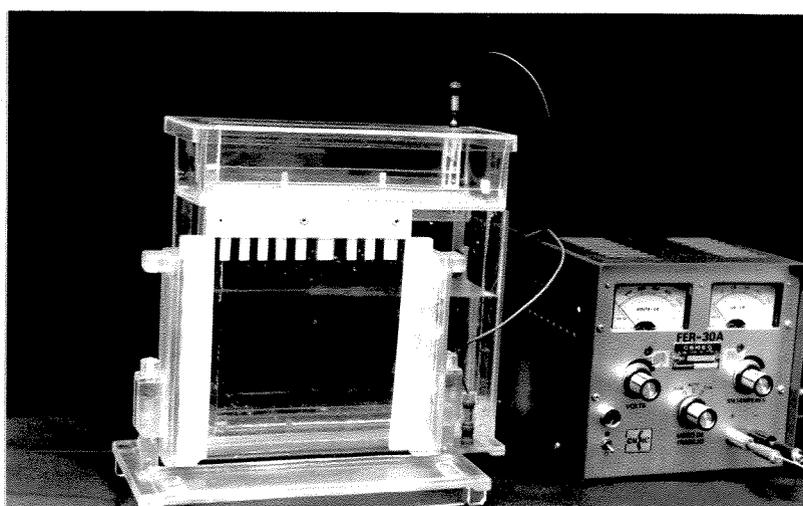


Figura 6: Aparelho de eletroforese (15x15x0,075cm) adaptado do modelo 2001 LKB, construído em acrílico pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro, no Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp.

Após a polimerização, o gel de resolução foi recoberto com o gel de empacotamento cuja composição foi:

SOLUÇÃO	VOLUME (ml) (6%)
tampão de empacotamento	0,63
água destilada	3,26
solução B	1,00
solução de SDS 10%	0,05
TEMED	0,05
persulfato de amônio 10%	0,05

O tampão de corrida foi Tris-Glicina 0,025M pH=8,3; 0,1% de SDS. Azul de bromofenol (0,001%) foi diluído no tampão de corrida e aplicado na parte superior do gel sendo utilizado como frente. As proteínas foram aplicadas num volume não maior que 15 μ l. A corrida foi feita à temperatura ambiente, a 18 mA, até que a frente de azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel.

As proteínas foram fixadas e coradas no gel com uma solução de 2g de Coomassie Brilliant Blue G-250, 225 ml de metanol, 225 ml de água destilada e 50 ml de ácido acético por uma noite. A solução descorante utilizada foi metanol, água destilada e ácido acético, na proporção de 1:8:3,5.

No caso em que se optou pela secagem dos géis, estes foram embebidos numa solução 3% de glicerol e 50% de metanol. Após 5 h a 5 °C, foram colocados para secar, envoltos em papel celofane.

Preparo das amostras para eletroforese

Os padrões (Sigma) utilizados na determinação das M.M. das proteínas, através de regressão linear, foram albumina de soro bovino (66 kg/mol), ovoalbumina (45 kg/mol), tripsinogênio (24 kg/mol), β -lactoglobulina (18 kg/mol) e lizosima (14,3 kg/mol) (figura 7).

O extrato foi sempre preparado (peso/volume) para que a quantidade de proteínas introduzida no gel estivesse em torno de 20 μ g. Em todos os casos, o tampão utilizado foi o fosfato de sódio 0,01M pH=7,14, contendo 2% de SDS e 1% de β -mercaptoetanol, e a denaturação se processou em banho-maria fervente durante, no mínimo, 10 minutos.

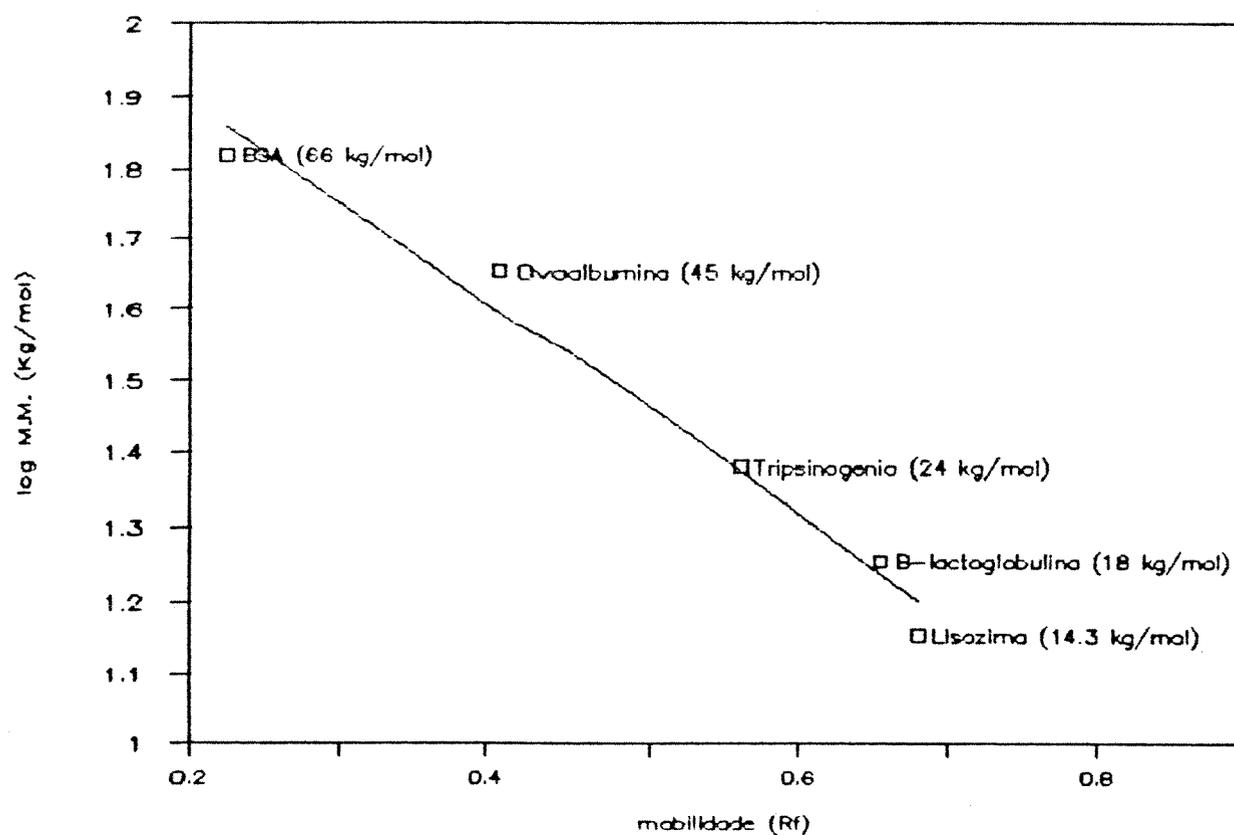


Figura 7: Reta padrão utilizada na determinação das M.M. (kg/mol) das proteínas (número entre parêntesis), obtida através de regressão linear. A mobilidade das proteínas nos géis (Rf) foi locada contra o log das M.M. das mesmas.

Determinação das Proporções Relativas das proteínas no gel

Após eletroforese, análises densitométricas por varredura foram realizadas utilizando-se um densitômetro Ultrosan XL laser modelo 2222-020 da LKB (Pharmacia). As proporções relativas de faseolina (M.M. entre 41 e 48 kg/mol), lectinas (M.M. entre 34 e 36 kg/mol) e leguminas (16 a 20 kg/mol) foram determinadas pelo cálculo da área dos respectivos picos em relação à área total de todos os picos obtidos na faixa de varredura. O grau de degradação da faseolina foi determinado por comparação da área dos picos da faseolina nativa com a área dos picos da faseolina degradada nos diferentes intervalos de tempo da reação.

Análise de Aminoácidos

A composição de aminoácidos das frações de albumina, globulina e faseolina pura foi determinada através de dois sistemas de derivação de aminoácidos, OPA (o-ftaldeído) [BENSON e HARE, 1975; JARRET *et al*, 1986] e FMOC (9- fluorenilmetilcloformato) [NÄSHOLM *et al*, 1987], utilizando-se um cromatógrafo HPLC com 2 bombas LKB mod. 2150, controladas por um gerador de gradiente mod. 2152.

Como padrão, foram usados 20 μ l de uma solução contendo todos os aminoácidos na concentração de 5mM.

Um grupo de amostras foi oxidado para determinação de cisteína como ácido cisteico e metionina como metionina sulfona [MOORE, 1963]. Para oxidação das proteínas, 20 μ l da amostra (10 mg/ml água milli-Q²) e 200 μ l de ácido perbórmico foram colocados em banho de gelo por 4 horas. Em seguida, 800 μ l de água milli-Q foram adicionados a cada amostra. Desse material, 200 μ l foram liofilizados para posterior hidrólise.

No grupo não oxidado, foram utilizados somente 20 μ l (10 mg/ml água milli-Q) de cada amostra.

As proteínas foram hidrolisadas, com auxílio de uma "Work Station" da Waters (Pico-tag, Millipore), em vapor de HCl 6N com 1% de fenol a 106°C, durante 24 horas. O HCl foi removido sob vácuo em liofilizador, e o hidrolisado foi retomado em 1 ml de água milli-Q.

²Água deionizada com resistência de 18,2 mega ω obtida em Milli-Q da Millipore.

Soluções para Derivação dos Aminoácidos

- Sistema OPA

- Tampão borato pH=9,5 - 2,47g ácido bórico em 90 ml água destilada, acertar o pH com NaOH 2N, completar para 100 ml;

- OPA-borato - 50mg em 1 ml de metanol + 6,5 ml de borato pH=9,5;

- Reagente OPA - 2,5 ml OPA-borato pH=9,5 + 20 μ l β ME antes do uso;

- Tampão fosfato de sódio -

Na ₂ HPO ₄	50mM
acetato de sódio	50mM
ácido acético conc.	\pm 1,5 ml (pH=7,25)
água milli-Q	960 ml (filtrar em milipore)
tetrahidrofuran	20 ml
metanol puro	20 ml

- Sistema FMOC

- Tampão borato 1M pH=6,3 - 6,18g de ácido bórico em 100 ml água + NaOH até atingir o pH;

- Reagente FMOC 15mM - 38,7 mg em 10 ml de acetona (Merck);

- Tampão acetato pH=4,0 -

ácido acético	8 ml
trietanolamina	1 ml (acertar o pH com NaOH 1N)
água milli-Q	completar para 1 l

Obtenção dos Derivados Fluorescentes dos Aminoácidos

- Sistema OPA

Para cada amostra foi retirada uma alíquota de 20 μ l, à qual se juntaram 60 μ l do reagente OPA. Como o derivado é instável, após exatamente 2 minutos, injetaram-se 10 μ l no HPLC. O detector de fluorescência (RF 530, Shimadzu) foi usado nos seguintes comprimentos de onda: excitação, λ = 250 nm e emissão, λ = 480 nm.

- Sistema FMOC

Foram retirados 200 μ l de cada amostra para 50 μ l de tampão borato pH=6,3 e 50 μ l do reagente FMOC. Após 30 segundos, foi feita a extração do reagente, agitando-se a mistura com 1 ml de pentano. Em seguida, a fase superior foi

removida com pipeta Pasteur, e a operação repetida por mais 2 vezes. As amostras oxidadas não foram diluídas, e as não-oxidadas foram diluídas 5 vezes. Foi injetado no HPLC um volume de 10 μ l de todas as amostras. O monitor de fluorescência foi usado nesse sistema nos comprimentos de onda de excitação, $\lambda = 263$ nm e emissão $\lambda = 313$ nm.

- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Tanto os aminoácidos das amostras não oxidadas como oxidadas foram derivados com FMOC. Somente os não oxidados foram derivados com OPA. Partiu-se de uma solução com 0,2 a 1 μ mol de aminoácidos totais/ml, e uma alíquota de 10 μ l foi injetada no HPLC. A amostra foi passada por uma coluna Suprapac ODS-2 com velocidade de fluxo de 1 ml/min à temperatura ambiente. O registro foi feito através de um registrador/integrador LKB mod.2221.

No sistema OPA, a coluna foi equilibrada com tampão fosfato pH=7,25 (solução A) e metanol 65% em água milli-Q (solução B), seguido de um gradiente:

tempo(min)	% Metanol 65%
0	20
20	60
25	75
35	100

No sistema FMOC, foi equilibrada com tampão acetato pH=4,0 (solução A) e metanol puro para cromatografia (Merck) (solução B), seguido do seguinte gradiente:

tempo(min)	% Metanol
0	45
25	65
40	85
45	100

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela altura dos picos comparados com a altura dos picos dos 20 aminoácidos usados como padrão. BSA foi utilizado como padrão do sistema de hidrólise de proteínas cujos resultados foram muito próximos dos obtidos em literatura [PETERS Jr., 1975]. Prolina, cisteína e metionina, determinados pelo sistema

FMOC, foram ajustados para valores equivalentes do sistema OPA, baseado nos valores relativos de valina nos 2 sistemas.

A análise de Lys é sujeita a maior erro do que dos outros aminoácidos, pelo fato do seu derivado ser instável, na metodologia usada. Triptofano não foi determinado, pois durante a hidrólise ácida das proteínas, o anel indólico é destruído por reações paralelas, não sendo possível recuperarem-se as baixas concentrações deste aminoácido por meios cromatográficos convencionais. Aspartato e asparagina são referidos como Asx e glutamato e glutamina como Glu. Os demais aminoácidos são referidos de acordo com a abreviatura internacional.

Análise Estatística

A análise estatística foi feita pela análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes [GOMES, 1976].

Capítulo 1

Albuminas

As albuminas têm sido consideradas como a fração enzimática da semente. A quantidade obtida dessas proteínas depende do material genético e do método de extração [CROY *et al*, 1984 apud PASQUALINI *et al*, 1991].

As albuminas foram analisadas no seu conteúdo na semente, no padrão eletroforético e na composição de aminoácidos e conseqüentemente foram inferidos alguns aspectos nutritivos da semente.

1.1 Métodos

As albuminas foram extraídas a partir de farinha crua e separadas com tampão borato e acetato de sódio ou água destilada (figura 5). Uma alíquota dessa fração foi retirada e dosada segundo o método de BRADFORD (1976).

Eletroforese e determinação da composição de aminoácidos foram feitas de acordo com a Metodologia Geral.

1.2 Resultados

1.2.1 Extração das Albuminas

De acordo com a figura 5, a fração solúvel proveniente da extração com borato foi dialisada contra água destilada ou contra tampão acetato de sódio 0,033M pH=5. No primeiro caso, foram necessários vários dias e várias trocas para que toda a globulina precipitasse, separando-se da albumina. Com acetato, essa precipitação foi mais rápida e mostrou ser igual à água destilada (quantitativa e qualitativamente). Conseqüentemente, os padrões eletroforéticos das albuminas obtidos tanto com acetato quanto com água foram idênticos.

O procedimento de extração sequencial usado (figura 5), baseado na diferença de solubilidade, permitiu uma separação rápida das proteínas em 2 frações, as albuminas e as globulinas.

Não houve diferença significativa na concentração de albuminas em relação à proteína total entre os 3 cultivares estudados. Goiano foi o cultivar que apresentou a maior concentração de proteínas totais (tabela 2).

As albuminas representaram cerca de 7,5% das proteínas totais (em torno de 2% da matéria seca da semente), as quais perfizeram ao redor de 25% da semente, sendo estas melhor extraídas com NaOH 0,2% (extraiu 98% das proteínas totais) ou com tampão fosfato de potássio (extraiu 50%).

Tabela 2: Conteúdo (%) de proteínas totais e albuminas em relação às proteínas totais de sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*.

	AET	GO	CAR
Prot. Totais (%)	24,0 ^a	27,0 ^b	22,0 ^a
Albumina (%)	7,1 ^a	6,4 ^a	8,6 ^a

Após eletroforese e análise por densitometria, verificou-se que a quantidade de lectinas (em relação à proteína total) e a proporção entre as prováveis formas E e L das isolectinas variaram nos 3 cultivares. A isolectina tipo L foi mais abundante em Aeté e Carioca, enquanto em Goiano, elas se mostraram em proporções mais equilibradas. Aeté apresentou concentrações maiores de lectinas que Goiano, entretanto, Carioca não mostrou diferenças significativas com relação aos demais (tabela 3).

Tabela 3: Concentração (%) de lectinas em relação à proteína total, às albuminas e destas à semente e proporção de suas subunidades nos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*.

	AET	GO	CAR
% Lectinas totais	14,6 ^a	9,7 ^b	13,3 ^{a, b}
% Lectinas nas albuminas	29,0 ^a	28,0 ^a	30,7 ^a
% Lectinas nas albuminas (sem.)	0,5 ^a	0,5 ^a	0,6 ^a
Proporção E:L	1:1,5	1:1	1:1,5

As lectinas foram muito abundantes na fração de albuminas dos 3 cultivares, que apresentaram concentrações semelhantes de lectinas nas albuminas em relação à semente.

1.2.2 Análise Eletroforética da Fração Albumínica

A figura 8 mostra a composição da fração de albuminas dos feijões, separados por SDS-PAGE, com as principais bandas e suas respectivas M.M. A análise eletroforética apontou 8 polipeptídeos principais (56,8; 40; 36; 34,5; 34; 30; 19 e 16 kg/mol) que foram semelhantes nos 3 cultivares. Aeté e Carioca não mostraram acentuadas diferenças quantitativas e qualitativas, mas foram marcadamente diferentes quando comparadas à Goiano.

Os polipeptídeos de M.M. ao redor de 30 e 16 kg/mol foram mais abundantes em Goiano, enquanto as de 36, 34,5 e 19 kg/mol ocorreram em maiores quantidades em Aeté e Carioca. A banda de 34 kg/mol de Goiano não foi observada nos outros dois cultivares.

Os polipeptídeos de M.M. de 36, 34,5 e 34 kg/mol podem ser considerados como lectinas, pois aparecem na faixa típica da maioria das lectinas de feijão. Aquela mais pesada seria isolectina tipo E e as mais leves, tipo L.

1.2.3 Composição de Aminoácidos

A composição de aminoácidos da fração de albuminas dos 3 cultivares de feijão, expressa em mol%, é apresentada na tabela 4, juntamente com os resultados obtidos por outros autores.

Os 3 cultivares mostraram uma grande semelhança na composição de aminoácidos. Aeté apresentou uma concentração mais elevada de Ser e Gly e uma concentração menor de Glx, Arg e Lys (~ 10%) em relação à Goiano e Carioca. Aeté e Goiano exibiram quantidades maiores de Met e Cys do que Carioca.

Na fração de albuminas, apenas 5, a saber, Asx, Glx, Ser, Lys e Gly, perfizeram 50% do total de aminoácidos. Enquanto isso, Met e Cys não atingiram 5% desse total.

1.3 Discussão

Dentre os tampões utilizados, o melhor foi a combinação de borato para extração e o acetato para separação das albuminas, usados por ERICSON e CHRISPEELS (1973), PUSZTAI e WATT (1974) e LIOI (1989).

Os valores de proteínas totais e de lectinas encontrados em Aeté, Goiano e Carioca concordam com os de BOLLINI e CHRISPEELS (1978) e aqueles de PUSZTAI *et al* (1979). A fração de albuminas varia muito de espécie para espécie e dentre os diferentes cultivares de uma mesma espécie. MA e BLISS (1978) encontraram uma variação de 11,1 a 19,8% de albuminas em relação à proteína total dentre os diferentes cultivares de feijão analisados. PASQUALINI *et al* (1991) constataram uma variação de 18 a 38% dessas proteínas em relação às proteínas totais de *Vicia*

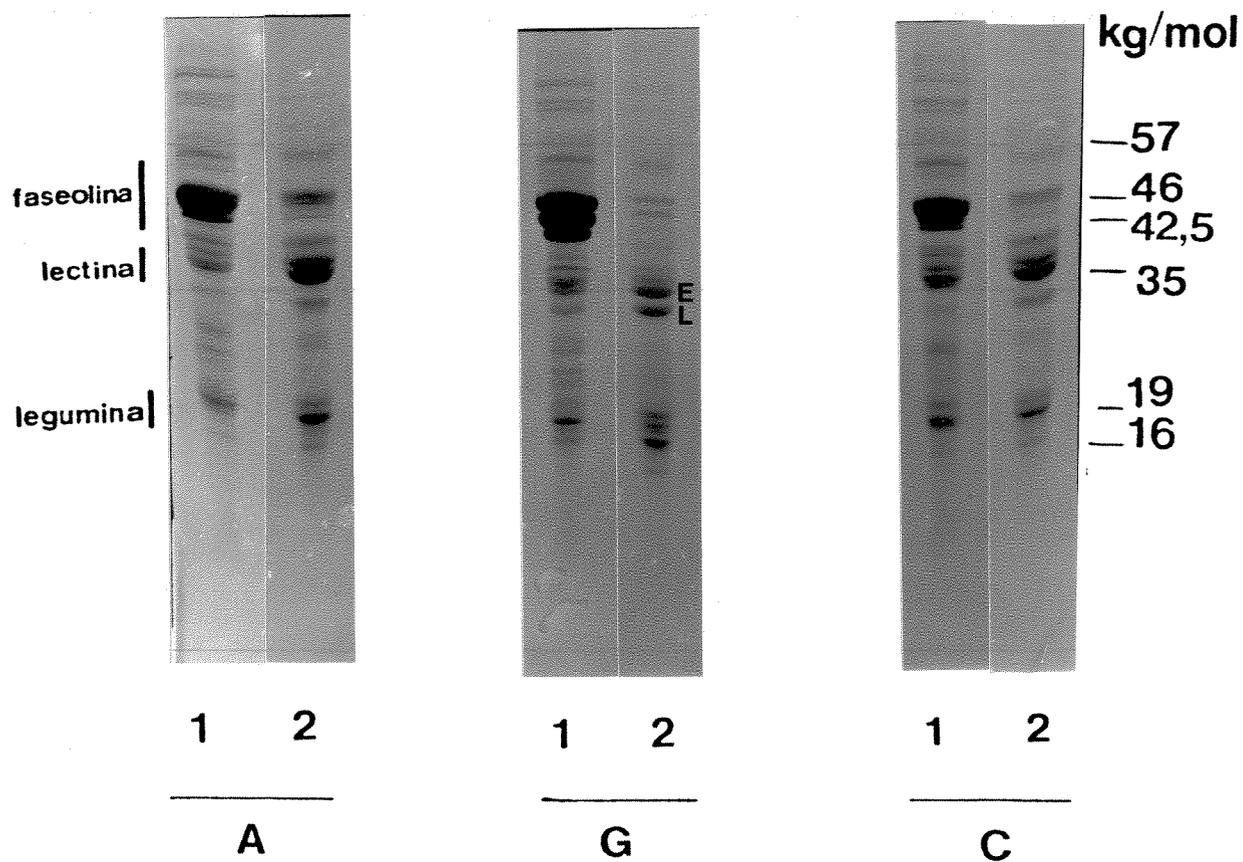


Figura 8: SDS-PAGE 13% das frações de proteínas totais (1) e de albuminas (2) de sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*. A= Aeté-3, G= Goiano precoce e C= Carioca. E- isolectina tipo E, L- isolectina tipo L.

Tabela 4: Composição de aminoácidos das albuminas de cotilédones dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*, juntamente com os resultados obtidos por outros autores. A composição foi determinada após hidrólise das proteínas. Glx= ácido glutâmico e glutamina; Asx= ácido aspártico e asparagina.

aminoácidos	mol%				
	AET	GO	CAR	Ref. 1 ^a	Ref. 2 ^b
Asx	11,97	11,57	12,81	14,21	5,86
Glx	8,43	10,78	9,94	12,79	10,09
Ser	13,09	8,02	9,02	5,53	9,24
His	1,92	1,63	1,86	3,45	3,19
Gly	8,45	6,93	6,71	4,67	7,53
Thr	7,00	7,13	7,44	7,44	4,62
Arg	2,67	3,49	3,21	6,47	9,64
Ala	7,61	7,08	6,69	4,91	6,54
Tyr	2,24	1,91	2,27	3,52	2,55
Met	1,21	1,90	1,29	1,01	4,08
Val	6,21	7,01	6,27	4,90	5,80
Phe	3,97	4,22	4,42	4,04	4,38
Ile	4,02	4,06	4,23	4,32	5,33
Leu	5,94	6,29	6,36	6,62	8,11
Lys	9,17	11,09	11,14	10,85	12,05
Pro	4,14	4,72	4,36	5,02	-
Cys	1,97	2,17	2,00	0,23	0,37

^a MA e BLISS, 1978-*Phaseolus vulgaris*.

^b PASQUALINI *et al*, 1991-*Vicia faba*.

faba, dependendo da linha genética analisada. Os cultivares estudados apresentam uma concentração inferior de albuminas quando comparados com *Vicia faba*, porém, mais próximas de alguns cultivares de feijão examinados por MA e BLISS (1978). Além disso, a quantidade de albuminas não variou entre os cultivares Aeté, Goiano e Carioca.

Por conterem uma grande proporção de lectinas em sua fração, as albuminas provavelmente apresentariam altas taxas de hemoaglutinação. Entretanto, isso não é regra geral, pois a lectina do cultivar "Pinto 111", que é constituída por uma só subunidade (hemilectina), não apresenta atividade hemoaglutinante [BROWN *et al.*, 1981b].

Sementes da família Papilionaceae mostram os principais polipeptídeos de albuminas na faixa de 34-35 kg/mol e 23-25kg/mol [PASQUALINI *et al.*, 1991]. Com as primeiras, coincidem as lectinas tipo albuminas, com 2 subunidades (~ 30 e 35 kg/mol) de pI variando de 4,5 a 6,9 [PUSZTAI e WATT, 1974]. Baseando-se nesses autores, em Aeté, Goiano e Carioca, as bandas com M.M. de 36 a 34 kg/mol muito provavelmente são subunidades de lectinas. Todavia, a M.M. dessas proteínas pode variar. Em feijão "Ojo de cabra", a isolectina tipo E (mais pesada) apresentou M.M. de 30 kg/mol [ALMEIDA *et al.*, 1991]. Em vista disso, a banda de 36 kg/mol poderia ser uma isolectina mais pesada (tipo E) e a de 34,5 kg/mol uma mais leve (tipo L).

Observando-se a tabela 4, verifica-se que os valores de aminoácidos obtidos em Aeté, Goiano e Carioca foram bem próximos dos encontrados por MA e BLISS (1978). Entretanto, os cultivares estudados apresentam concentrações superiores de Ser, Gly, Ala, Val e Cys e concentrações menores de His, Arg e Tyr.

Quando os 3 cultivares são comparados com *Vicia faba*, observa-se que apresentam quantidades maiores de Asx, Thr e Cys e quantidades menores de His, Arg, Met e Leu.

Apesar de os cultivares estudados mostrarem uma concentração de Cys quase que 10 vezes superior aos outros materiais, a quantidade de aminoácidos sulfurados em relação à *Vicia faba* é inferior, dada a maior quantidade de Met nesta espécie. Porém, quando comparados com os resultados de MA e BLISS (1978), Aeté, Goiano e Carioca exibem uma concentração 3 vezes maior destes aminoácidos.

As albuminas contribuem bastante para o valor nutritivo da semente, já que apresentaram altas concentrações de aminoácidos sulfurados e de Lys. Sob esse aspecto, Aeté, Goiano e Carioca seriam excelentes materiais numa alimentação complementada por cereais e para cruzamentos genéticos, visando a um aumento da fração de albuminas e conseqüentemente da qualidade nutricional do feijão.

Por outro lado, as albuminas demonstraram ser também uma fração potencialmente bastante tóxica, por exibirem altas concentrações de lectina, concordando com os resultados obtidos por PUSZTAI *et al.* (1985) [apud ANTUNES e SGARBIERI, 1980]. Entretanto, essa toxicidade pode ser suprimida com o cozimento (calor),

o que elimina os efeitos de inibição na absorção de açúcares (glicose) e de outros nutrientes [LIENER, 1976].

Dentre os cultivares estudados, Goiano é o mais indicado, considerando-se a fração de albuminas, para possíveis cruzamentos genéticos e numa alimentação complementar pois mostrou ser potencialmente o menos tóxico (com a menor concentração de lectinas). Além disso, foi o que apresentou a maior quantidade de proteínas e os maiores teores de aminoácidos sulfurados e Lys, importantes sob o ponto de vista nutricional.

Apesar de ocorrerem algumas diferenças nas quantidades de proteínas e de lectinas totais, não se pode inferir aspectos filogenéticos entre os 3 cultivares com relação à essa fração, já que os mesmos não apresentaram diferenças significativas na concentração de albuminas e os padrões eletroforéticos foram muito semelhantes.

A fração de albuminas tem sido objeto de poucos estudos, não somente quanto à composição de aminoácidos, como principalmente em relação aos aspectos nutricionais. Mais estudos seriam de extrema valia, uma vez que grande parte das lectinas das sementes de feijão ocorreram nas albuminas.

1.4 Conclusões

1. O método mais adequado para extrair e separar as albuminas das outras frações, foi a combinação da extração com borato e a separação com acetato.
2. A fração de albuminas demonstrou ser potencialmente bastante nutritiva em relação aos aminoácidos Met, Cys e Lys e ao mesmo tempo bastante "tóxica", devido à alta concentração de lectinas. Por isso, merece mais atenção, para que possa ser melhorada para o consumo humano.
3. Através das albuminas não é possível inferir aspectos filogenéticos entre os cultivares estudados, pois seus padrões eletroforéticos foram muito semelhantes.

Capítulo 2

Globulinas

As globulinas são a principal fração de proteínas de reserva em feijão e, portanto, uma investigação mais detalhada foi realizada com a mesma. Essa fração se divide em vicilinas (7S) e leguminas (11S), sendo a faseolina a principal vicilina de *Phaseolus vulgaris* [BOLLINI e CHRISPEELS, 1978; MA e BLISS, 1978].

Este capítulo examina o conteúdo, a análise eletroforética e a composição de aminoácidos das globulinas; a composição estrutural proteica, o conteúdo de açúcares totais e o grau de glicosilação, a composição de aminoácidos, a solubilidade em função do pH do meio (faixa de precipitação), o comportamento imunológico e a susceptibilidade à enzima digestiva (tripsina) *in vitro* da faseolina, bem como diferentes métodos utilizados para separação de leguminas e vicilinas, o grau de glicosilação e a faixa de precipitação das leguminas.

2.1 Métodos

2.1.1 Extração de Globulinas

As globulinas foram extraídas a partir de farinha crua com borato de sódio e separadas das albuminas, através de diálise contra acetato de sódio ou água destilada, adaptado de SANTORO (1988) (figura 5).

2.1.2 Isolamento e Purificação de Faseolina

Este procedimento envolve a precipitação com sulfato de amônio e a purificação da proteína através de uma coluna de afinidade (adaptado de SANTORO (1988)).

Precipitação com sulfato de amônio

Esse método produz frações ricas em globulinas e ocorre através de um processo conhecido como "salting-out" (figura 9), sendo utilizados 40 e 60% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$. Em seguida, as amostras obtidas foram aplicadas numa coluna de afinidade (Fetuína-Sepharose 4B ativada com CNBr) com a finalidade de se obter faseolina pura, isto é, livre de lectinas.

Coluna de Fetuína-Sepharose 4B ativada com CNBr

Este método isola seletivamente macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos. Neste trabalho, a matriz utilizada foi Fetuína-Sepharose-4B, ativada com CNBr, que tem afinidade pelas lectinas.

- 1-Preparo da fetuína

Um volume de soro fetal de bezerro foi misturado com dois volumes de solução de acetato de zinco 0,03M/etanol 28,3% (v/v) a pH= 6,4 e agitado a -5°C por 16h.

A mistura foi centrifugada e o sedimento descartado. Foi adicionado etanol ao sobrenadante para elevar a concentração de 19(v/v) para 25%(v/v) e acetato de bário para uma concentração final de 0,02M (5,11 g/l) e o pH=6,7. A mistura foi mantida a -5°C por duas horas e, então, centrifugada. O sedimento foi descartado.

Ao sobrenadante foi adicionado etanol para elevar a concentração de 25 (v/v) para 40% (v/v) e foi mantida a -10°C por 16h. Esta solução foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. O sedimento (fetuína) foi ressuspensionado em citrato sódico 0,05M e dialisado contra água destilada, congelado e liofilizado.

- Solução de acetato de zinco 0,03M/etanol absoluto 28,3% (v/v):

$$V_a = \frac{(V_s \times N\%) - (V_e \times 100)}{100 - N\%},$$

onde V_a é o volume de etanol a ser adicionado, V_s é o volume inicial da solução, $N\%$ é o volume final da concentração requerida e V_e é o volume inicial de etanol.

- 2-Acoplamento da fetuína à Sepharose

Foram pesados 4g de Sepharose-4B ativada com CNBr (Pharmacia) que foram embebidos com HCl 1mM (200 ml/g de Sepharose) por 3 dias (para cada g de Sepharose obtêm-se 3,5 vezes o volume de gel). O gel foi filtrado e lavado com tampão de acoplamento ($NaHCO_3$ 0,1M pH=8,3 com NaCl 0,5M) várias vezes.

Duzentos mg de fetuína foram solubilizados em tampão de acoplamento e centrifugados a 27000xg por 20 minutos. Descartou-se o sedimento.

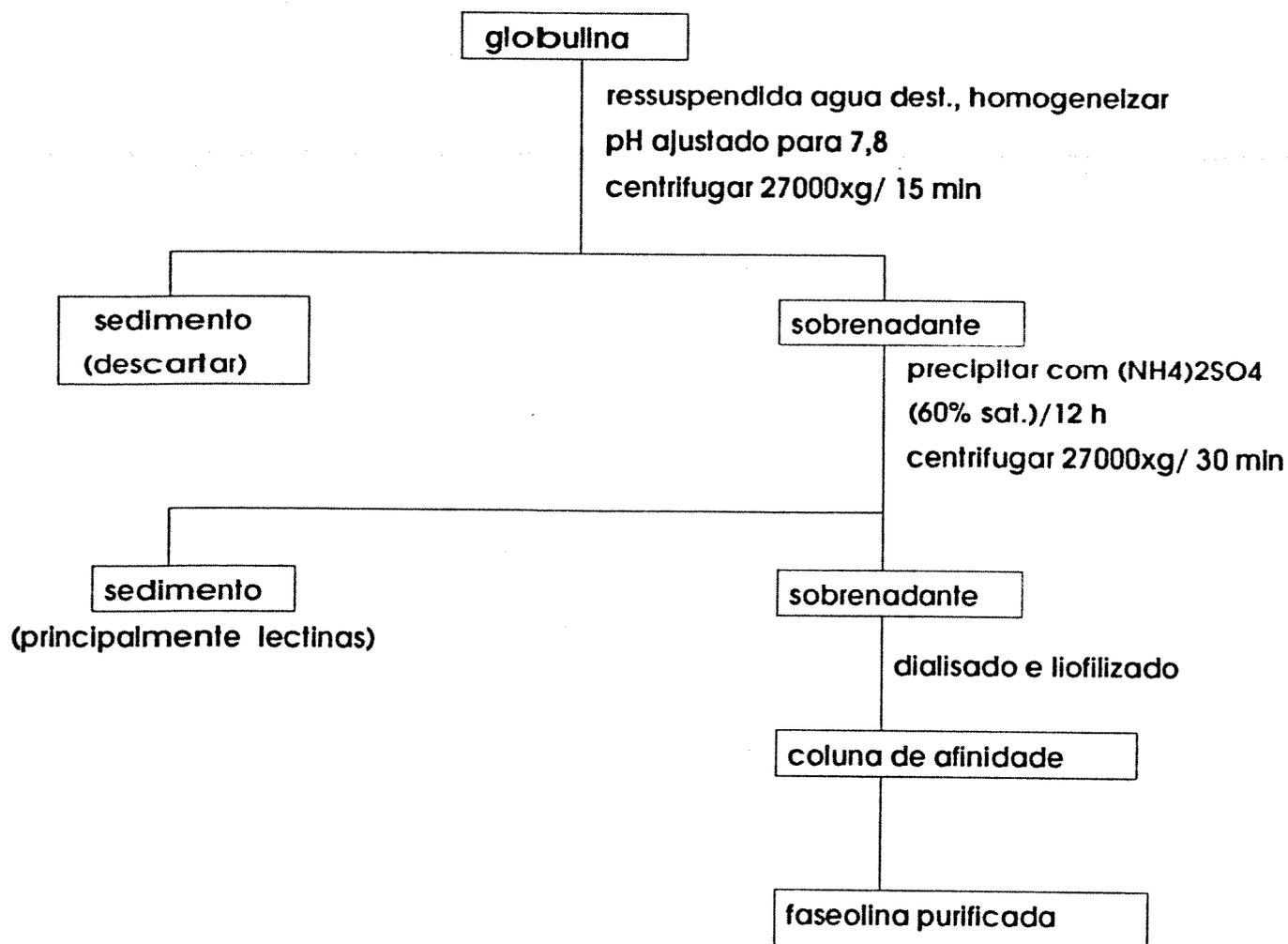


Figura 9: Obtenção e purificação de faseolina de sementes de *Phaseolus vulgaris*, utilizando-se precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ e cromatografia de afinidade, adaptado de SANTORO (1988).

A suspensão de gel foi então misturada lentamente com a solução de fetuína, sem agitador magnético, por 4 horas e depois foi filtrada. Em seguida foi lavada com Tris-glicina 0,2M pH=8 várias vezes, medindo-se depois o volume em proveta (esperar o gel assentar). Foram obtidos 15 ml de gel que foram colocados numa seringa de 20 ml, utilizada como coluna descendente.

A coluna foi lavada com o tampão de acoplamento seguido de tampão acetato de sódio 0,1M pH=4, contendo NaCl 0,5M; tampão de acoplamento; tampão tris 0,05M/ácido acético 0,025M/NaCl 0,1M pH=8, CaCl₂ 75mM, MnCl 90μM, 0,1% NaN₃ (tampão I); tampão Gly 0,05M/HCl 7mM/NaCl 0,5M pH=3 (tampão II) e regenerada com tampão I (tampão de equilíbrio).

- 3-Aplicação da amostra

Dez ml de amostra foram aplicados na coluna e eluídos com 50 ml do tampão I, seguido por 50 ml do tampão II e novamente pelo tampão I. Para retirar outras proteínas, a coluna foi lavada com uréia 8M e foi regenerada com o tampão I.

Foram coletadas 40 frações de 100 gotas, mantendo-se um fluxo de 60 ml/h que foram monitoradas a 280nm utilizando-se um espectrofotômetro Varian series 634.

2.1.3 Reação de Degradação Enzimática da Faseolina

A reação de degradação, adaptada de DESHPANDE e NIELSEN (1987a), foi realizada *in vitro*. Faseolina liofilizada foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,01M pH=7,8 com CaCl₂ 0,02M para obtenção de uma concentração de 5 mg/ml. Essa amostra foi incubada em banho-maria a 37 °C por 1 h, bem como 2 mg de tripsina solubilizada em 1 ml de HCl 1 mM.

Para cada amostra, foram adicionados 200 μl da solução da enzima que foi agitada e mantida em banho-maria. A relação enzima-substrato foi de 1:10 (m/m).

As amostras foram mantidas a 37°C por 30 segundos, 1, 5 e 120 minutos. A reação foi interrompida retirando-se alíquotas de 200 μl da amostra e colocando-as em frascos previamente aquecidos a 100°C com tampão Tris-HCl 0,01M pH=7,8 contendo CaCl₂, 4% de SDS e 2% de β-ME. As amostras foram então denaturadas nessa temperatura por 15 minutos e submetidas à eletroforese.

2.1.4 Precipitação Zonal

Este método consiste na separação de proteínas com pI diferentes. A coluna é equilibrada com um tampão cujo pH é igual ao pI de uma das proteínas. Quando a amostra é introduzida na coluna, a proteína cujo pI é o mesmo do tampão de equilíbrio precipita.

Uma coluna cromatográfica descendente com 28 cm de altura e capacidade de 200 ml, foi preenchida com Sephadex G-50, suspensa e equilibrada com tampão

citrato de sódio pH=4,8, baseado em SCHOLZ *et al* (1974) e DERBYSHIRE e BOULTER (1976).

Quinze ml de solução de globulina liofilizada, extraída de acordo com a figura 5, foram aplicados na coluna, seguidos do tampão pH=7,4, mantendo-se um fluxo de 30 ml/h. Foram coletadas de 35-40 frações com 100 gotas por tubo que foram monitoradas em comprimento de onda de 280 nm utilizando-se um espectrofotômetro Varian series 634. Após a completa separação, a coluna foi regenerada com tampão pH=4,8. Todas as operações foram realizadas à temperatura ambiente.

2.1.5 Avaliação da Faixa de Precipitação de Vicilinas e Proteínas Tipo legumina

Para se estimar a amplitude da faixa de precipitação das vicilinas (principalmente faseolina) e de proteínas tipo legumina em função do pH do meio, a fração de globulinas dos 3 cultivares foi precipitada em 3 faixas diferentes de pH, de acordo com a figura 10. As proteínas liofilizadas foram ressuspendidas em água destilada e o pH foi acertado para 7,8-8 com NaOH 0,1M. O pH para promover a precipitação foi ajustado com HCl 0,1M.

2.1.6 Extração com NaCl

Um dos principais métodos de separação de vicilinas e leguminas é através da diferença de solubilidade em soluções salinas. A extração e separação dessas proteínas foi feita como se segue na figura 11, utilizando-se soluções de NaCl 0,5 e 0,05M para extração independente das mesmas.

2.1.7 Preparo do Anticorpo

Foram inoculados em coelhos, via intramuscular, 2 ml de extrato total de proteínas de Goiano precoce em ACF (Adjuvante completo de "Freund"), 1:1 (200mg antígeno/animal), 2 vezes em um intervalo de 13 dias. Após 23 dias foram inoculados 2 ml desse mesmo extrato solubilizado em NaCl 0,15M, 1:1 (200 µg/ml), via intradérmica em vários pontos do dorso do animal. Essa inoculação foi repetida mais três vezes a cada 8 dias. Os animais foram sangrados a cada 8 dias durante dois meses.

O sangue sem anticoagulante foi colocado em banho-maria a 37°C por 10 minutos e depois a 4°C por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 2000 RPM durante 10 minutos. O soro foi congelado e as hemácias descartadas.

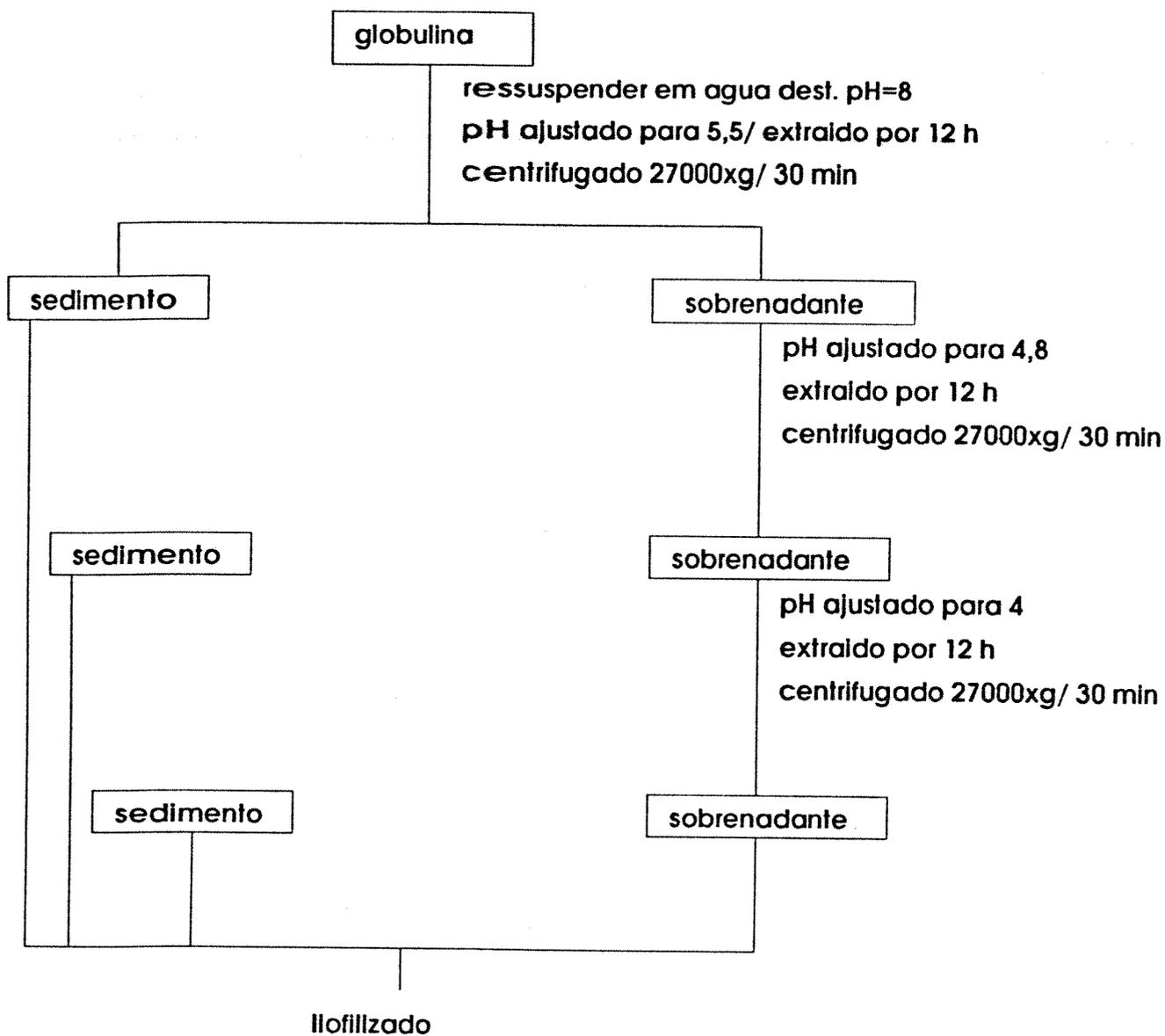


Figura 10: Precipitação isoeétrica de vicilinas e leguminas de *Phaseolus vulgaris*, a partir de globulina em 3 pH diferentes.

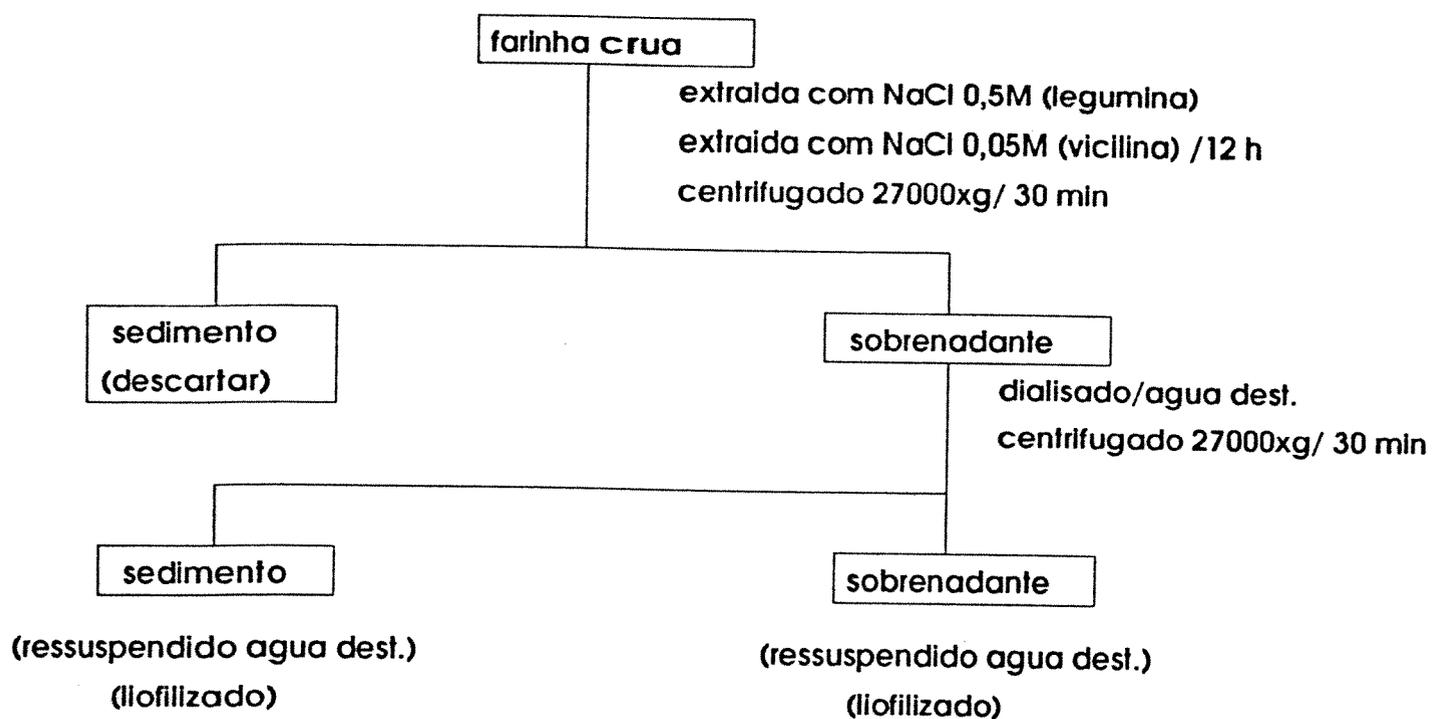


Figura 11: Obtenção de leguminas e vicilinas de *Phaseolus vulgaris* a partir de sementes, utilizando-se soluções salinas.

2.1.8 Teste de Imunodifusão-dupla

Sobre lâminas de microscopia foram colocados 3 ml de solução de ágar 1% dissolvido em K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,05M contendo NaCl 0,15M. O anticorpo (anti proteínas totais de Goiano) foi testado contra os antígenos através de imunodifusão dupla de acordo com OUCHTERLONY (1949). Os antígenos (frações de proteínas totais liofilizadas e faseolina pura dos 3 cultivares) foram dissolvidos em NaCl 0,15M numa concentração de 2 mg/ml. Foram aplicados 20 μ l de soro (centro) e de antígeno puro e diluído (1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:40), em 2 repetições na mesma lâmina.

A difusão ocorreu a 5°C durante 24h em caixas de germinação seladas, saturadas com água. As lâminas foram secas sob ar quente e as proteínas que não reagiram foram lavadas (3 vezes / 15 min) com NaCl 0,15M. Em seguida, as lâminas foram coloridas com Coomassie Blue Brilliant G-250 0,3% em metanol, água e ácido acético (4,5:4,5:1) por 15-20 minutos e descorada com a mesma solução na proporção de 3,5:8:1, sem o corante.

2.1.9 Grau de Glicosilação e Dosagem de Açúcares Totais

As reações de glicosilação foram feitas utilizando-se ácido periódico e reagente de Schiff, de acordo com DOERNER e WHITE (1990).

Açúcares totais ligados à faseolina pura foram dosados pelo método de antrona [UMBREIT *et al.*, 1972]. As absorbâncias obtidas foram comparadas com uma reta padrão de glicose nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 μ g/ml, sendo feitas 3 leituras para cada uma.

- Nota: Outros métodos utilizados nas análises das proteínas descritos nesse capítulo (extração e dosagem de proteínas, eletroforese, análise de aminoácidos) foram descritos na Metodologia Geral.

2.2 Resultados

2.2.1 Extração das Globulinas

As globulinas mostraram ser a principal fração proteica em feijões (tabela 5), sendo a faseolina a vicilina mais importante, enquanto as leguminas representaram a menor porção das globulinas (tabela 6).

Não houve diferenças significativas nas concentrações de globulinas em relação à proteína total entre os 3 cultivares estudados. Até foi o que mostrou a maior quantidade de lectinas nas globulinas, enquanto Goiano e Carioca não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 5: Concentração (%) de globulinas em relação à proteína total e de lectinas nas globulinas nas sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*.

	AET	GO	CAR
% globulinas	33,25 ^a	48,25 ^a	41,46 ^a
% lectinas nas globulinas	9,9 ^a	4,0 ^b	5,0 ^b

Tabela 6: Concentração (%) de faseolina (F%) e de proteína tipo legumina (T-L) em relação à proteína total e à globulina, obtidos através de densitometria após eletroforese, nas sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*.

	AET		GO		CAR	
	Prot. total	Globulina	Prot. total	Globulina	Prot. total	Globulina
% F	41,2 ^a	55,0 ^a	53,0 ^b	71,0 ^b	45,0 ^a	61,5 ^c
% T-L	3,0 ^a	5,0 ^a	4,2 ^a	1,8 ^b	4,5 ^a	3,8 ^{ab}

Além disso, Goiano mostrou a maior concentração de faseolina, seja em relação à proteína total, seja em relação à globulina. Porém, exibiu a menor quantidade de proteína tipo legumina em relação à globulina.

Aeté e Carioca não apresentaram diferenças significativas com relação à concentração de faseolina na proteína total. Entretanto, Aeté foi o que exibiu a menor concentração de faseolina em relação à globulina. Os 3 cultivares não mostraram diferenças significativas na concentração de proteínas tipo leguminas em relação à proteína total. Porém, Aeté apresentou a maior concentração de proteínas tipo legumina em relação às globulinas.

As lectinas estiveram em quantidades bem menores nas globulinas do que na fração correspondente de albuminas (ver tabelas 5 e 3). Dentre os cultivares estudados, Aeté foi o mais abundante em lectinas-globulinas, enquanto Goiano e Carioca não apresentaram diferenças significativas.

2.2.2 Análise Eletroforética das Globulinas

A figura 12 mostra a composição polipeptídica das globulinas separadas por SDS-PAGE unidimensional de Aeté, Goiano e Carioca.

A fração de globulinas dos 3 cultivares apresentou 8 bandas principais, variando de 56,8 a 19 kg/mol. Elas se dividiram em 3 grupos mais importantes: a faseolina, as lectinas e as proteínas tipo legumina.

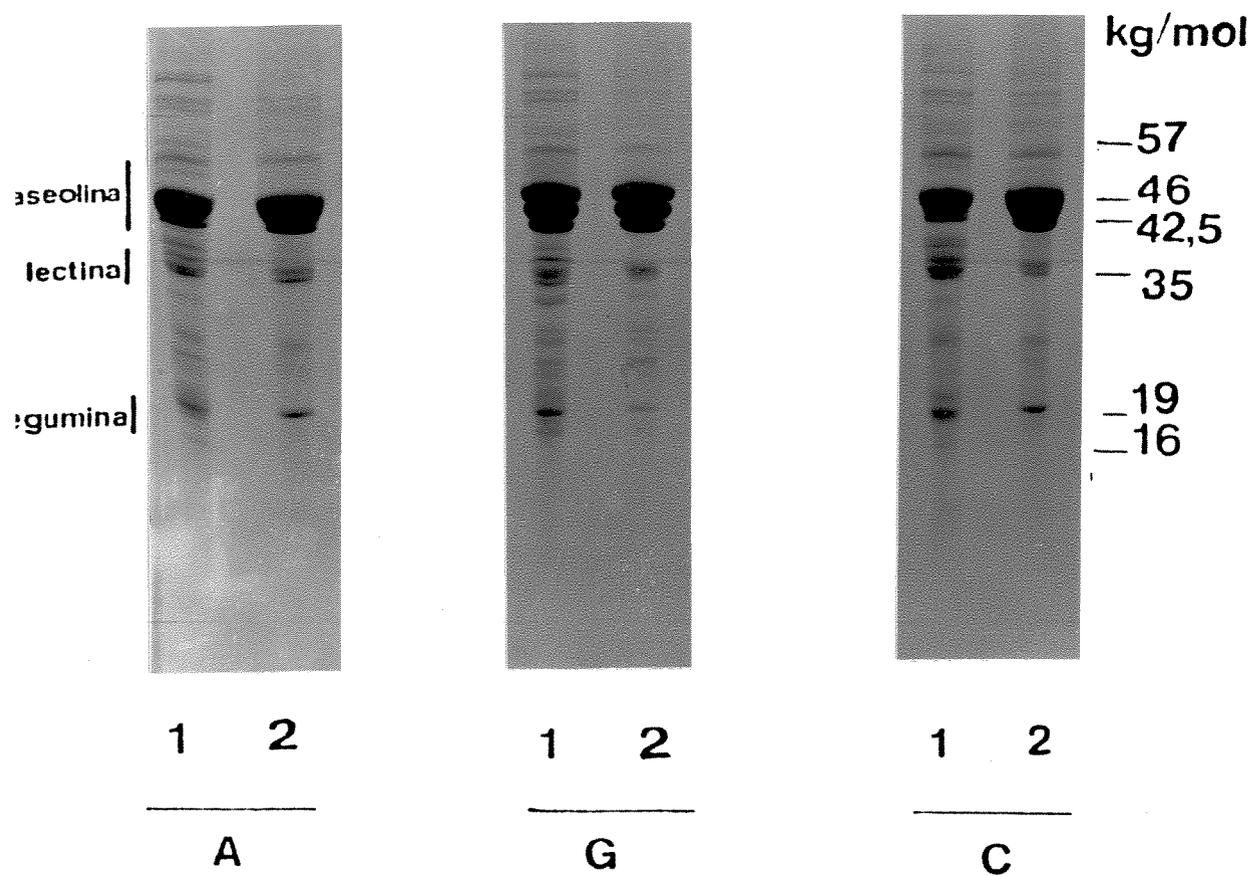


Figura 12: SDS-PAGE 13% das frações de proteínas totais (1) e de globulinas (2) de sementes dos 3 cultivares de *Phascolus vulgaris*. A= Aeté, G= Goiano e C= Carioca.

As subunidades da faseolina variaram entre 41 e 48 kg/mol, dependendo do cultivar (ver discussão adiante). As lectinas de Aeté e Carioca exibiram M.M. de 36 e 34,5 e as principais de Goiano, 34,5 e 30 kg/mol. A principal proteína tipo legumina apresentou M.M. de 19 kg/mol.

Ao contrário do que ocorreu com as lectinas e as bandas de 56,8 e 19 kg/mol que se apresentaram tanto nas albuminas quanto nas globulinas, a faseolina esteve presente somente na fração globulínica.

2.2.3 Composição de Aminoácidos da Fração Globulínica

A composição de aminoácidos das globulinas dos 3 cultivares de feijão, expressa em mol%, é mostrada na tabela 7, juntamente com os resultados dos trabalhos de outros autores.

A composição de aminoácidos das globulinas foi muito semelhante nos 3 cultivares. Goiano apresentou a maior quantidade de Lys, mas praticamente metade do conteúdo de Cys em relação à Aeté e Carioca.

Na fração de globulinas, apenas 5, Asx, Glx, Ser, Leu e Lys (mais que 10%) perfizeram 50% do total de aminoácidos. Enquanto isso, os sulfurados não atingiram nem 3% desse total, indicando uma deficiência dos mesmos.

Em relação às albuminas, as globulinas apresentaram maiores concentrações de Glx, His, Arg, Phe e Leu e menores concentrações de aminoácidos sulfurados.

2.2.4 Comportamento Imunológico das Globulinas

A reação de imunodifusão com anti-soro de proteínas totais de Goiano contra extratos de proteínas totais dos 3 cultivares revelou 2 tipos de linhas de precipitação (reação de identidade ou precipitina) para os 3 cultivares: um maior e mais forte e outro mais fraco. Essas linhas ocorreram em todas as diluições, decrescendo em intensidade conforme as diluições aumentavam (figura 13).

Além disso, devido à reação de identidade nos 3 cultivares, pôde-se inferir que o anticorpo produzido contra as proteínas de Goiano reconheceu aquelas de Aeté e Carioca, indicando a presença de determinantes antigênicos comuns entre os 3 cultivares (figura 13-1).

2.2.5 Purificação e Isolamento da Faseolina

Preparações de globulina procedente dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris* foram precipitadas com 40 e 60% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$. Essa última saturação produziu frações solúveis constituídas basicamente de faseolina (figura 14).

Este material, por sua vez, foi separado em 2 frações por cromatografia de afinidade. A primeira fração (F), proveniente da coluna, consistia de proteínas que

Tabela 7: Composição de aminoácidos da fração de globulinas das sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*, juntamente com o resultado obtido por outros autores. Glu= Ácido glutâmico e glutamina, Asx= Ácido aspártico e asparagina.

aminoácido	mol%				
	AET	GO	CAR	Ref.1 ^a	Ref.2 ^b
Asx	12,34	11,26	11,66	12,4	4,48
Glx	13,90	13,60	13,86	15,1	12
Ser	8,37	8,68	8,78	6,7	9,14
His	2,24	2,30	2,33	2,6	4,66
Gly	5,34	5,44	5,88	2,7	8,3
Thr	4,01	3,83	4,14	3,4	4,56
Arg	4,05	3,90	4,14	5,0	16,53
Ala	4,89	4,86	5,24	3,0	3,08
Tyr	2,62	2,57	2,54	3,5	1,6
Met	1,56	1,23	1,33	0,7	1,5
Val	6,61	6,04	6,11	5,2	4,39
Phe	5,26	5,17	5,25	6,6	5,04
Ile	4,96	4,79	4,93	5,6	4,68
Leu	8,46	8,48	8,78	9,1	11,15
Lys	10,02	13,21	10,26	5,6	5,8
Pro	4,72	4,32	4,25	2,9	-
Cys	0,62	0,33	0,53	0,3	1,32

^aPUSZTAI e WATT, 1970-*Phaseolus vulgaris*

^bPASQUALINI *et al*, 1991-*Vicia faba*

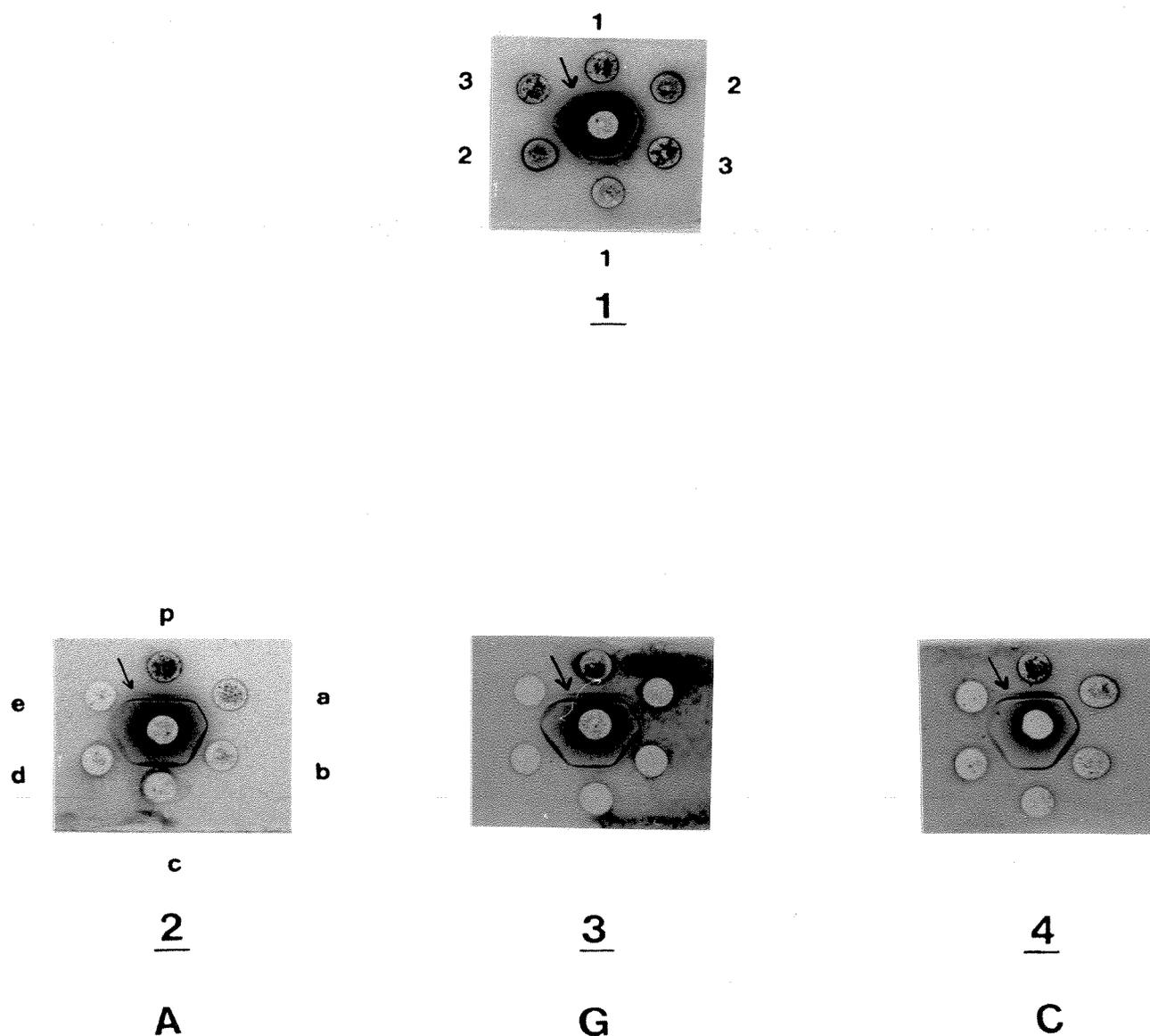


Figura 13: 1 -Imunodifusão dupla com anticorpo no centro contra frações de proteínas totais puras dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris* .1-Aeté, 2- Goiano, 3- Carioca. 2, 3, 4-Imunodifusão dupla com anticorpo no centro contra frações de proteínas totais puras (p) e diluídas (a-1:5, b-1:10, c-1:15, d-1:20 e e-1:40) dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris* . A= Aeté, G= Goiano e C= Carioca. A seta indica a linha de precipitina mais fraca.

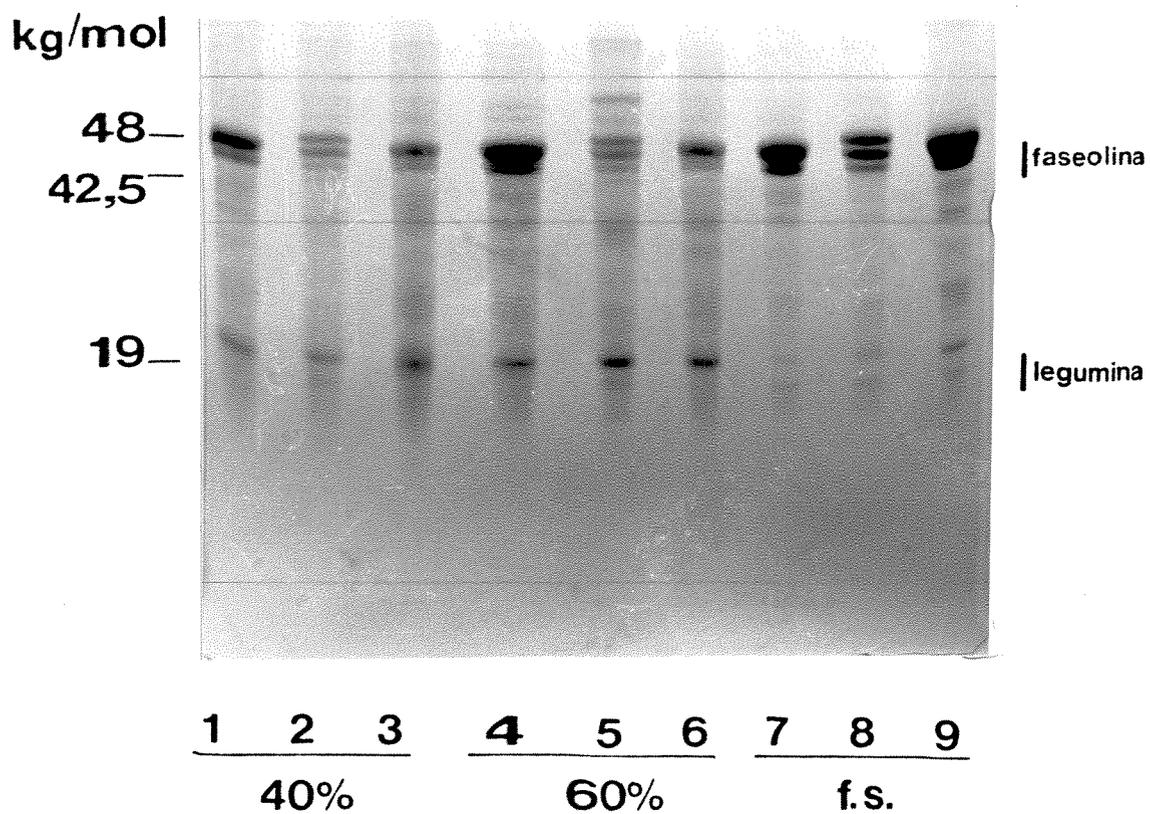


Figura 14: SDS-PAGE 13% de frações de globulinas precipitadas com 40 e 60% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$ e a fração solúvel (f.s.) desta última respectivamente. 1, 4 e 7- Aeté; 2, 5 e 8- Goiano e 3, 6 e 9- Carioca

não apresentavam afinidade com a fetuína (faseolina livre de lectinas), ao contrário da segunda fração (L), eluída com tampão pH=3, constituída somente de lectinas (figura 15).

2.2.6 Estrutura da Faseolina

Através de SDS-PAGE unidimensional, os padrões das subunidades de faseolina apresentaram-se basicamente sob 2 padrões diferentes, um referente à Aeté e à Carioca e o outro à Goiano (figura 16).

Os padrões de faseolina de Aeté e Carioca foram praticamente idênticos, mostrando uma subunidade maior (α) de 46,3 ($\pm 0,7$) kg/mol e 3 subunidades menores (β , γ e δ) com 45,1 ($\pm 0,3$), 44 ($\pm 0,6$) e 42,5 ($\pm 0,6$) kg/mol. Já o cultivar Goiano apresentou 2 subunidades maiores (α e β) de 48,1 ($\pm 0,8$) e 44,6 ($\pm 0,7$) kg/mol e 2 menores (γ e δ) de 42,4 ($\pm 0,6$) e 41,3 ($\pm 0,5$) kg/mol.

A tabela 8 mostra a proporção encontrada entre as subunidades de faseolina dos 3 cultivares, obtidas através de densitometria, e do cultivar "Processor" [SANTORO, 1988].

Tabela 8: Proporção (razão) entre as subunidades de faseolina das sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris* estudados e do cultivar "Processor".

Cultivar	Razão entre as subunidades			
	α	β	γ	δ
AET	5	2	1	2
GO	2	2	1	0,1
CAR	5	2	1	2
"Processor"	2	0,2	2	1

As subunidades de Aeté e Carioca variaram na mesma proporção, diferindo de Goiano, que se aproximou mais do tipo de proporção encontrado no cultivar Processor.

2.2.7 Composição de Aminoácidos da Faseolina

A composição de aminoácidos da faseolina pura, expressa em mol% dos aminoácidos analisados, é apresentada na tabela 9, juntamente com os resultados obtidos por outros autores.

A composição de aminoácidos nos 3 cultivares foi muito semelhante. Aeté mostrou a maior concentração de Ser e Carioca de Asx e Lys em relação aos outros 2 cultivares estudados. Apesar de Aeté praticamente não conter Cys, ele foi o cultivar

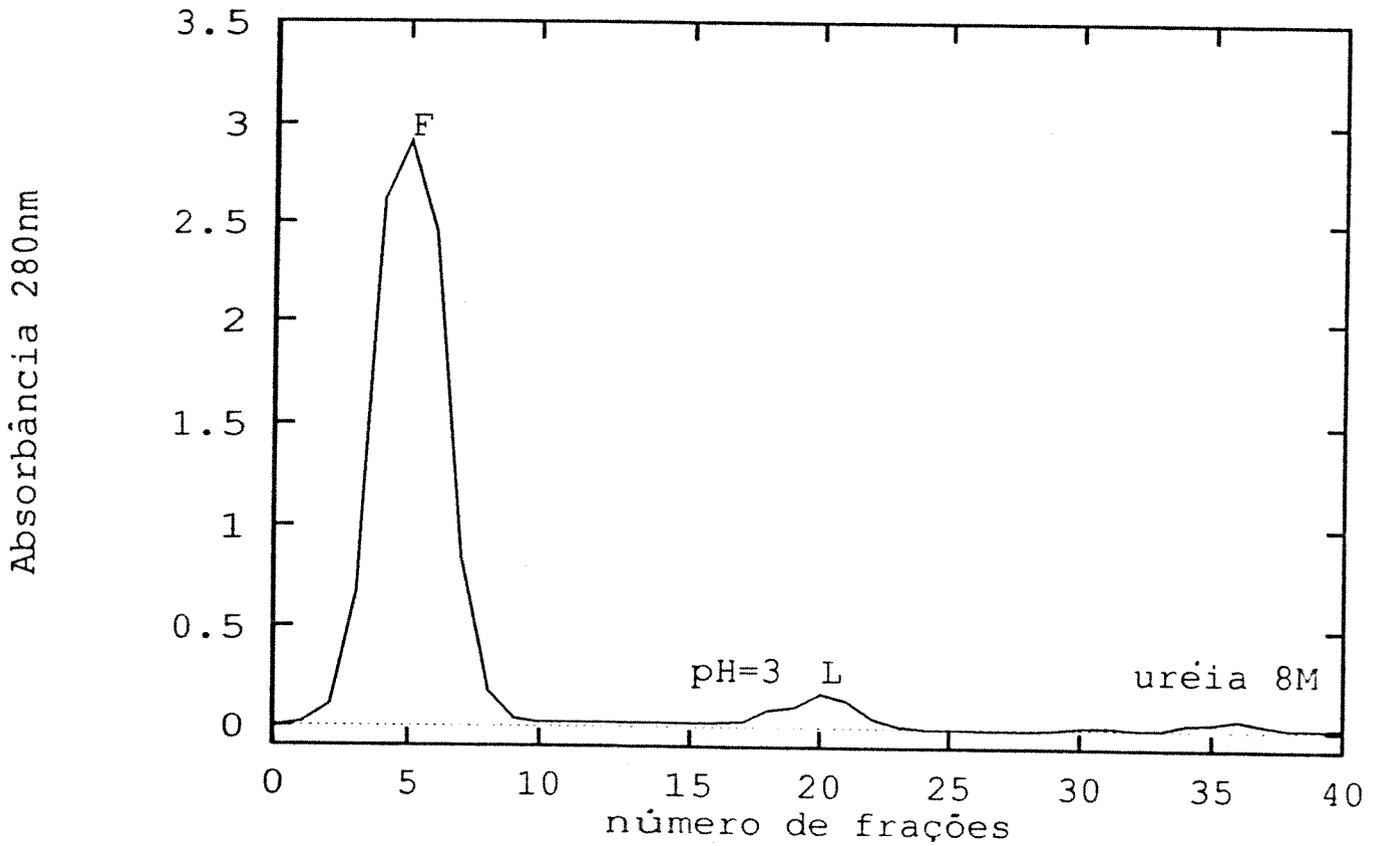


Figura 15: Padrão de eluição da fração solúvel após 60% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$, proveniente da coluna de afinidade. A fração F continha fascolina e a fração L, eluída com HCL-Gly 0,05M com NaCl 0,5M, pH=3, continha lectinas.

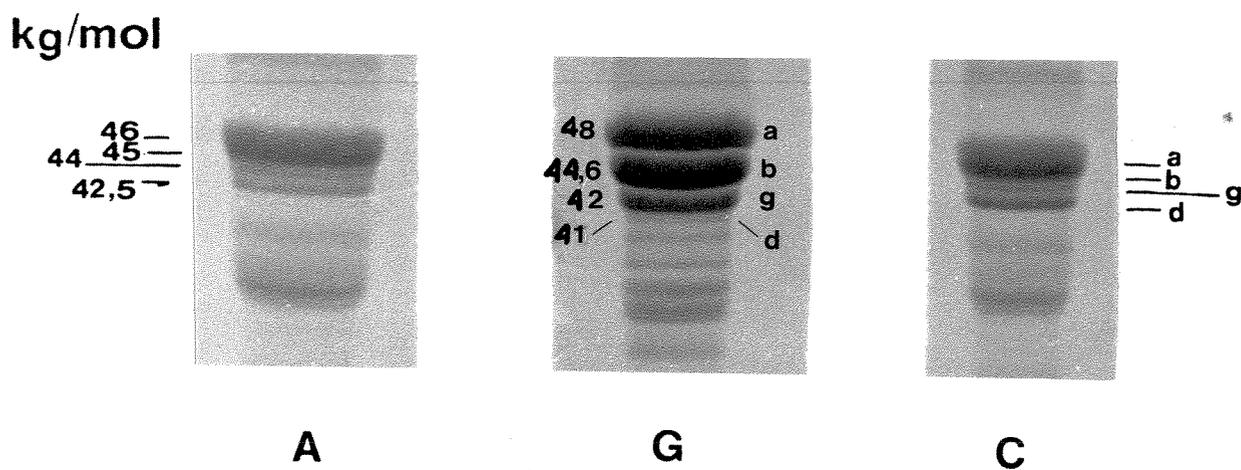


Figura 16: SDS-PAGE 13% das frações de fascolina dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*, com as 4 subunidades, α (a), β (b), γ (g) e δ (d) e suas respectivas M.M. em kg/mol. A=Aeté, G=Goiano e C=Carioca.

Tabela 9: Composição de aminoácidos da faseolina purificada das sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*, juntamente com os resultados obtidos por outros autores. Glx= Ácido glutâmico e glutamina, Asx= Ácido aspartico e asparagina.

aminoácido	mol %				
	AET	GO	CAR	Ref.1 ^a	Ref.2 ^b
Asx	12,56	13,01	14,18	13,07	13,4
Glx	15,36	15,64	14,79	18,6	14,6
Ser	9,97	8,67	8,51	4,73	9,6
His	2,33	2,58	2,06	3,35	2,4
Gly	5,93	5,57	5,99	3,2	5,8
Thr	3,63	3,46	3,08	3,02	4,2
Arg	3,87	4,09	3,52	5,6	4
Ala	4,90	4,83	4,49	2,9	5,2
Tyr	2,55	2,51	2,16	3,9	2,7
Met	1,39	1,18	1,11	0,88	0,7
Val	5,92	5,73	5,05	6	6,5
Phe	5,61	5,63	4,96	6,3	5,6
Ile	4,72	5,07	4,55	6,1	6,2
Leu	8,59	8,84	8,28	10,7	10
Lys	8,47	8,90	13,58	7,9	5,4
Pro	4,14	4,08	3,51	2,6	3,7
Cys	0,07	0,21	0,19	0,18	0,2

^aMA e BLISS, 1978-*Phaseolus vulgaris*

^bBARKER *et al*, 1976-*Phaseolus vulgaris* cv. Seafarer

que apresentou a concentração mais alta de aminoácidos sulfurados em relação à Goiano e Carioca.

Na fração de faseolina, apenas 5, a saber, Asx, Glx, Ser, Leu e Lys, perfizeram 50% do total de aminoácidos. Enquanto isso, Met e Cys não atingiram nem 2% desse total, indicando uma deficiência dos mesmos.

2.2.8 Comportamento Imunológico da Faseolina

Reação de imuno difusão dupla também foi feita com faseolina pura, obtida através da coluna de afinidade, utilizando-se o mesmo anti-soro da reação com a fração de proteínas totais. Como resultado, observou-se a formação de uma única linha de precipitação, também bastante intensa em todos os cultivares, confirmando que a linha maior e mais proeminente da reação anterior fosse a faseolina. Além disso, indicou que a outra linha, mais fraca, era a lectina, pois a ausência desta linha estaria associada com a retirada da lectina pela coluna de afinidade. Do mesmo modo, a intensidade da precipitina diminuía conforme a diluição aumentava (figura 17).

O anticorpo produzido contra as proteínas de Goiano e que continha faseolina reconheceu também as faseolinas de Aeté e Carioca, indicando a presença de determinantes antigênicos comuns entre estas proteínas dos 3 cultivares (figura 17-1).

2.2.9 Padrão de Degradação Enzimática *In Vitro* da Faseolina

Os padrões de faseolina nativa e degradada com tripsina dos 3 cultivares em SDS-PAGE são mostrados nas figuras 18,19 e 20. As 4 subunidades principais da faseolina nativa foram completamente degradadas após 5 minutos de digestão com tripsina, formando polipeptídeos com M.M. variando de 25 a 18 kg/mol.

Após 2 horas de digestão, os principais polipeptídeos formados (4) em Aeté e Carioca apresentavam M.M. de 24,5, 23,7, 21 e 19 kg/mol. Goiano mostrou 3 polipeptídeos principais com 23,9, 21 e 19,1 kg/mol.

A primeira subunidade a ser degradada foi a α , cuja mobilidade, em Goiano, foi levemente alterada em SDS-PAGE, de 48,5 decresceu para 46,6 kg/mol. Neste cultivar também, a subunidade β foi a mais resistente, permanecendo com a mesma mobilidade até 5 minutos de digestão. As demais, γ e δ foram hidrolisadas mais facilmente nos 3 cultivares estudados.

A faseolina de Goiano foi a mais resistente à proteólise quando comparada com as de Aeté e Carioca. Após eletroforese e análise densitométrica, verificou-se que nos 30 segundos iniciais, somente ~45% da faseolina de Goiano haviam sido degradados, enquanto nos outros 2 cultivares ~ 75% dessa proteína já estavam hidrolisados

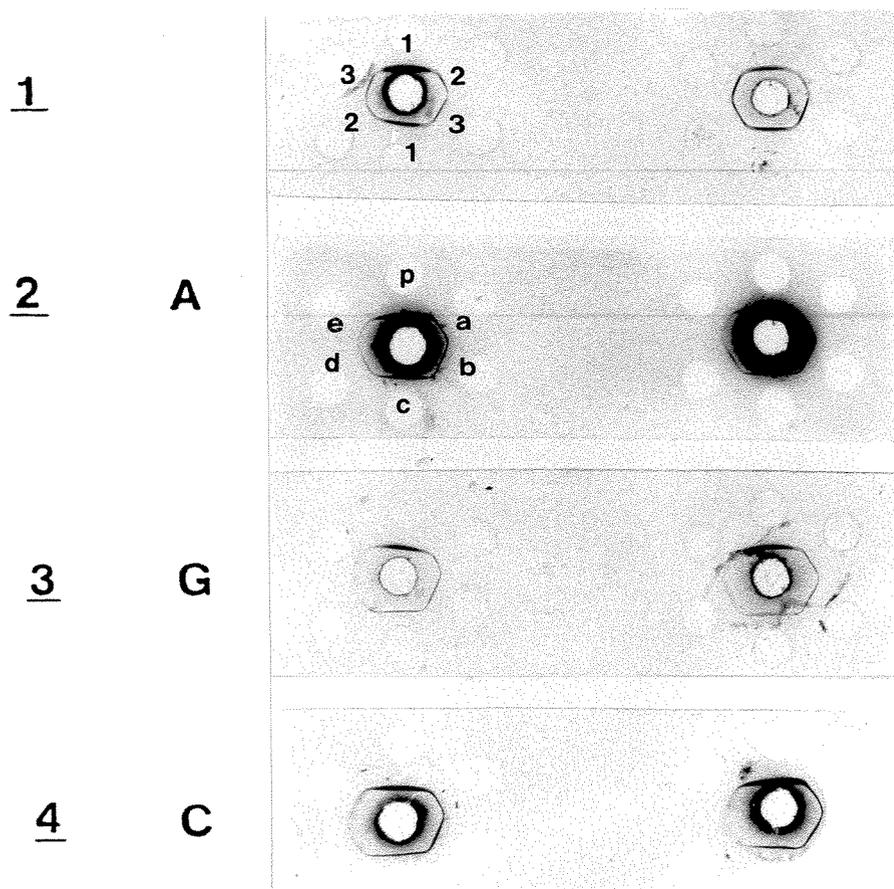


Figura 17: 1-Imunodifusão dupla com anticorpo no centro contra faseolina pura dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris* 1-Aeté, 2-Goiano, 3-Carioca. 2, 3, 4-Imunodifusão dupla com anticorpo no centro contra faseolina pura (p) e diluída (a-1:5, b-1:10, c-1:15, d-1:20 e e-1:40) dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*. A= Aeté G= Goiano e C= Carioca. O lado direito é repetição do esquerdo.

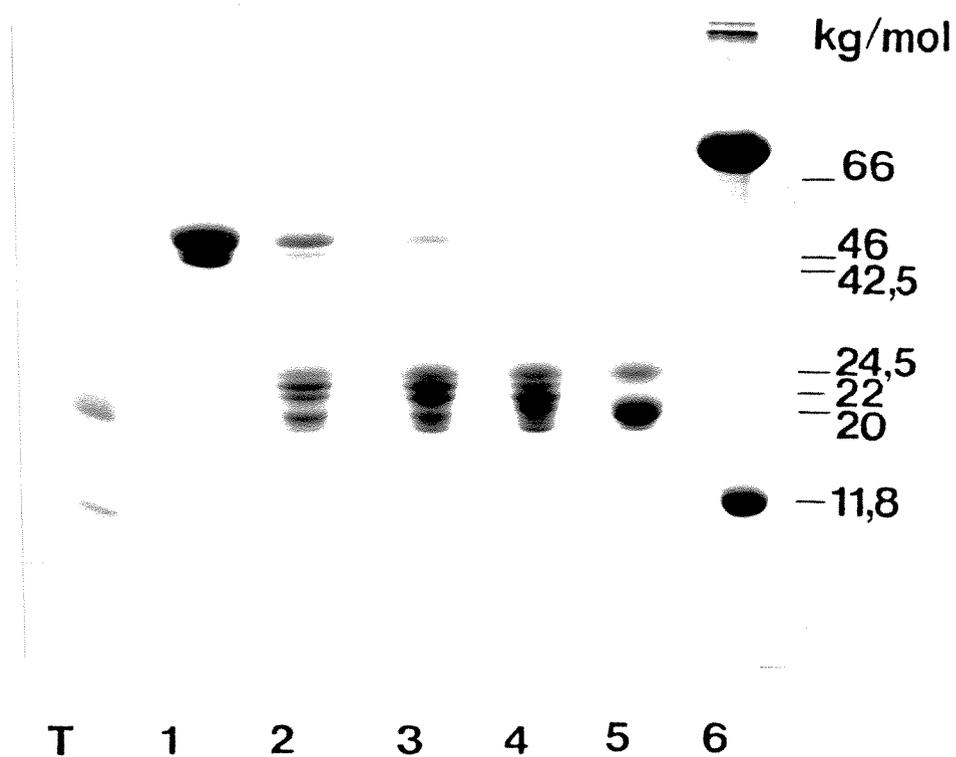


Figura 18: SDS-PAGE 15% do padrão de fasciolina de Acté, submetida à ação sequencial da tripsina por 30 segundos (2), 1 min (3), 5 min (4) e 2h (5). Fasciolina nativa (1). Padrões (6), BSA e citocromo-c. T=tripsina.

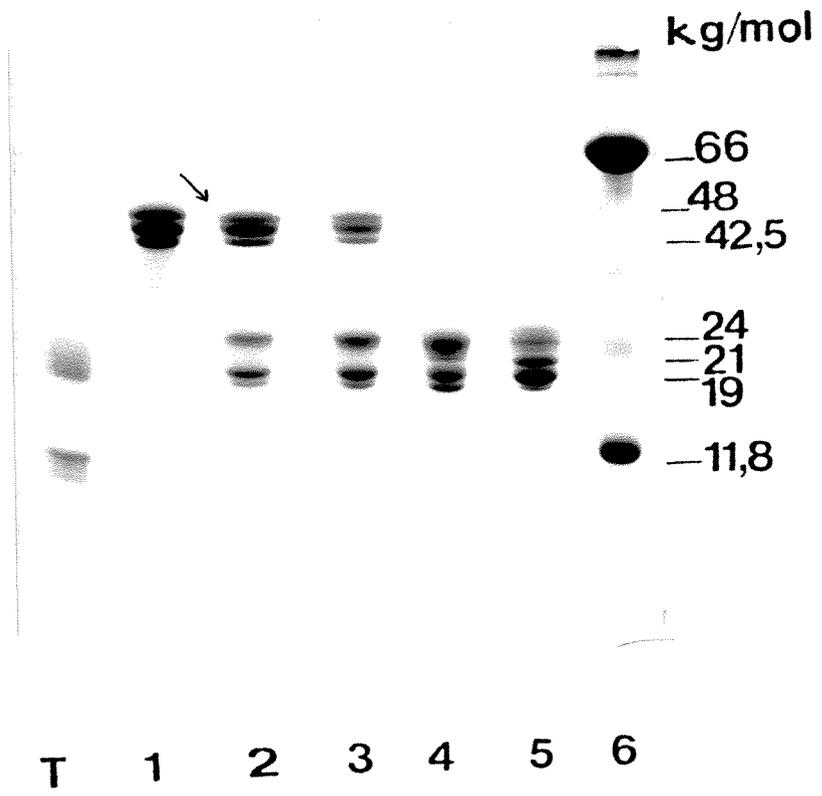


Figura 19: SDS-PAGE 15% do padrão de fasinol de Goiano, submetida à ação sequencial da tripsina por 30 segundos (2), 1 min (3), 5 min (4) e 2h (5). Fasinol nativa (1). Padrões (6), BSA e citocromo-c. T=tripsina. A seta aponta a mobilidade ocorrida na subunidade α .

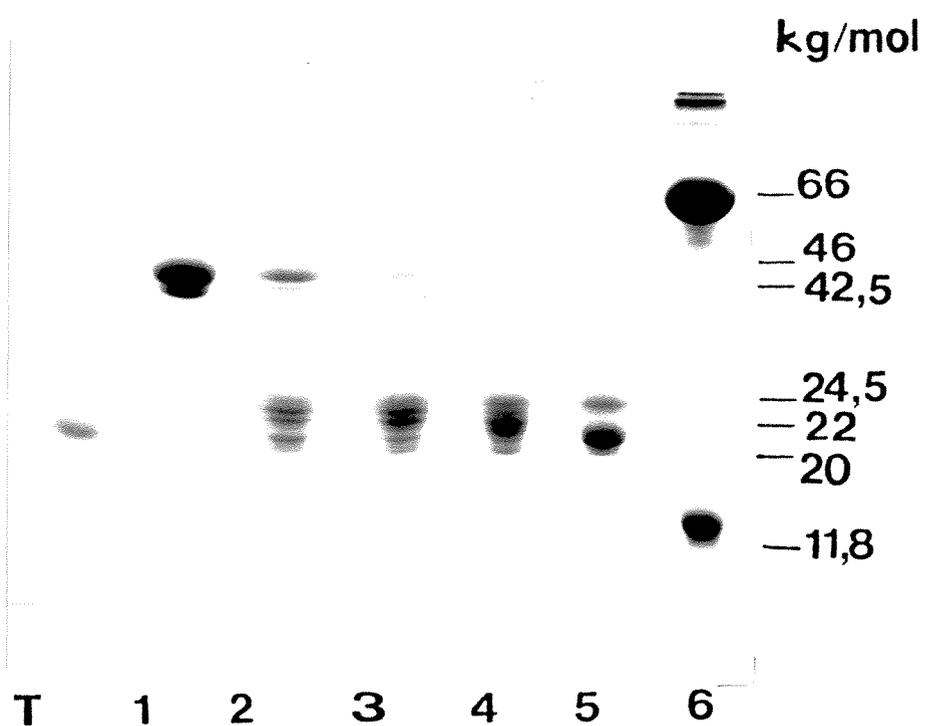


Figura 20: SDS-PAGE 15% do padrão de fasciolina de Carioca, submetida à ação sequencial da tripsina por 30 segundos (2), 1 min (3), 5 min (4) e 2h (5). Fasciolina nativa (1). Padrões (6), BSA e citocromo-c. T=tripsina.

(figura 21). Ao final de 2h, permaneceram somente os polipeptídeos de ~ 20 kg/mol. Toda a faseolina inicial foi degradada.

2.2.10 Grau de Glicosilação e Conteúdo de Açúcares da Faseolina

A fração de faseolina pura de Aeté mostrou 5,5% ($\pm 0,2$) de carboidratos totais, enquanto Goiano apresentou 7,9% ($\pm 0,2$) e Carioca, 15,3% ($\pm 0,7$). Verifica-se assim que o grau de glicosilação da faseolina variou conforme o cultivar, sendo o Carioca aquele com o maior conteúdo de açúcares, seguido do Goiano e do Aeté. A reação com ácido periódico-Schiff mostrou que todas as subunidades eram glicosiladas e o grau de glicosilação se distribuiu indistintamente entre as mesmas.

2.2.11 Extração e Análise Eletroforética das Proteínas Tipo legumina

As principais bandas das proteínas com características de legumina são mostradas na figura 22-P. Elas apresentaram M.M. de 20, 19 e 16 kg/mol, sendo a de 19 kg/mol a maior e mais intensa banda. O polipeptídeo de 19 kg/mol foi o mais intenso em Aeté e Carioca, enquanto o de 16 kg/mol foi o mais pronunciado em Goiano. Esses polipeptídeos poderiam corresponder às subunidades básicas da proteína tipo legumina.

Essas bandas foram precipitadas quando as globulinas sofreram saturação a 60% com $(NH_4)_2SO_4$. Esta fração, quando submetida à coluna de afinidade, eluiu em 2 frações: a primeira contendo tanto vicilinas quanto proteínas tipo legumina e a segunda, somente com lectinas (figura 23). A fração solúvel da precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ não continha nenhuma proteína com característica de legumina (ver figura 14)

A precipitação zonal das globulinas dos 3 cultivares produziu um único pico, indicando que as proteínas tipo legumina eluíram junto com as vicilinas, numa só fração, não sendo possível separá-las por esse método (dados não apresentados).

Frações de globulina dos 3 cultivares foram precipitadas em 3 faixas de pH diferentes, 5,5, 4,8 e 4. Pelo volume do precipitado, praticamente toda a proteína foi precipitada em pH=5,5, porém, houve uma leve precipitação nos outros pH.

Submetendo-se estas frações de precipitados proteicos à SDS-PAGE, verificou-se que os perfis eletroforéticos eram idênticos, mostrando que a faseolina, as lectinas-globulinas e as proteínas tipo legumina precipitavam em pH entre 5,5 e 4 (figura 24).

Em extração com soluções salinas de NaCl 0,05 e 0,5M, a principal banda das proteínas tipo legumina (19 kg/mol) foi extraída somente na solução salina mais

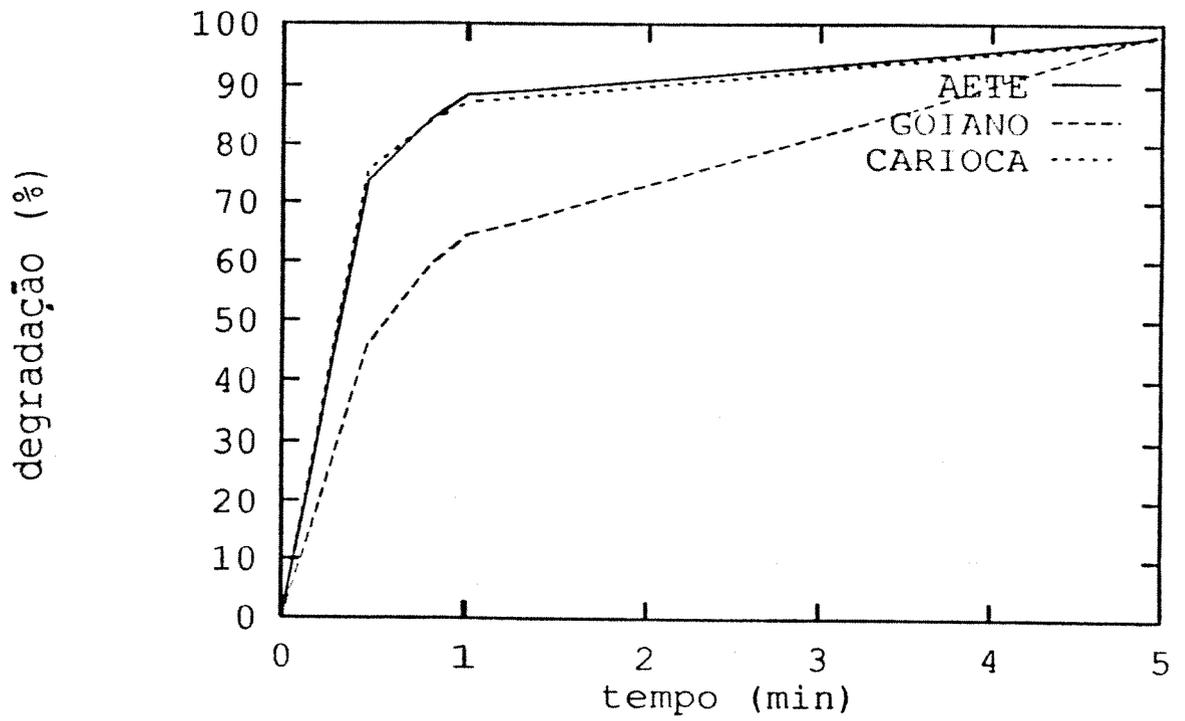


Figura 21: Padrão de degradação da faseolina por tripsina dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris* em Tris-HCL 0,01M, pH=7,8 contendo $CaCl_2$ 0,02M, durante os 5 minutos iniciais do processo.

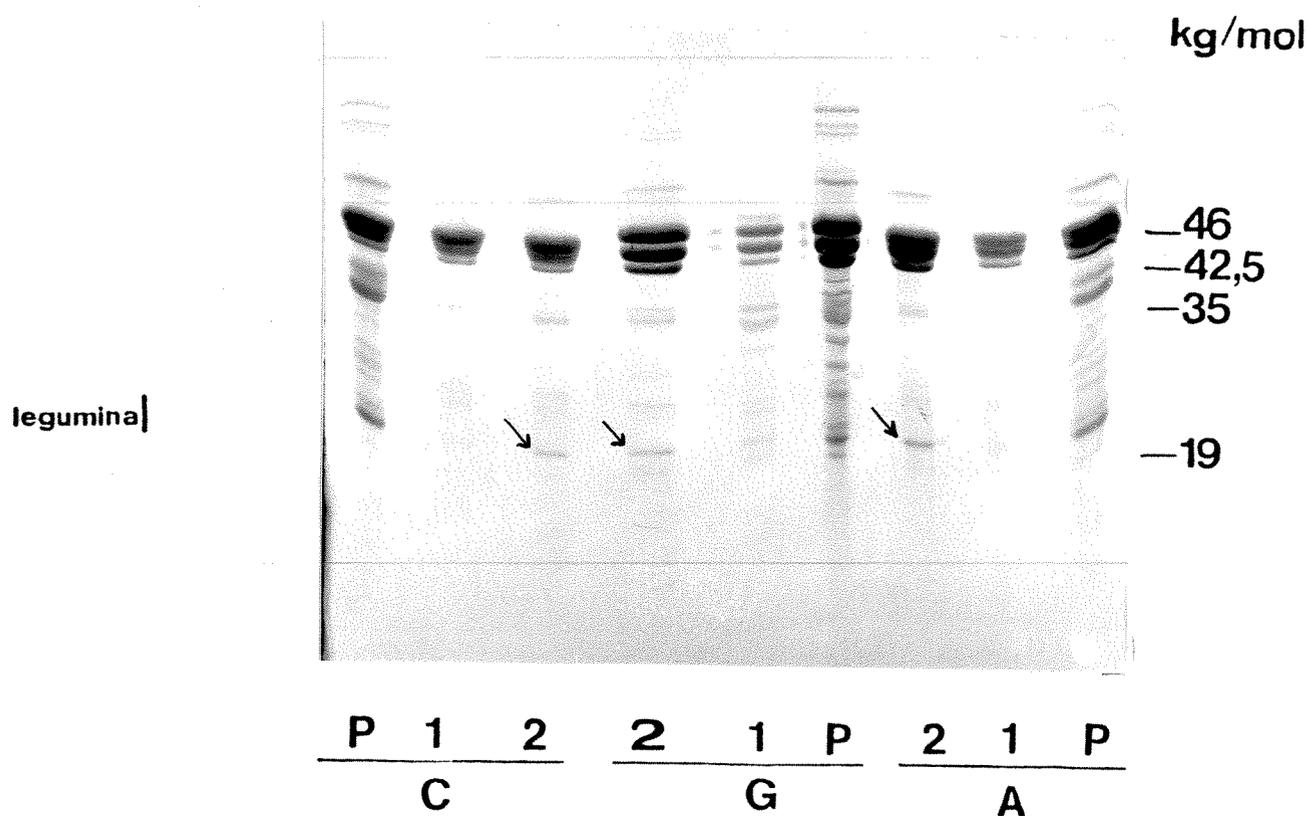


Figura 22: SDS-PAGE 13% das frações de proteínas extraídas com NaCl 0,05 (1) e 0,5M (2) de Aeté (A), Goiano (G) e Carioca (C). (P)- Perfil de proteínas totais de Carioca, Goiano e Aeté (1, 6 e 9, respectivamente). A seta indica a legumina extraída nos 3 cultivares.

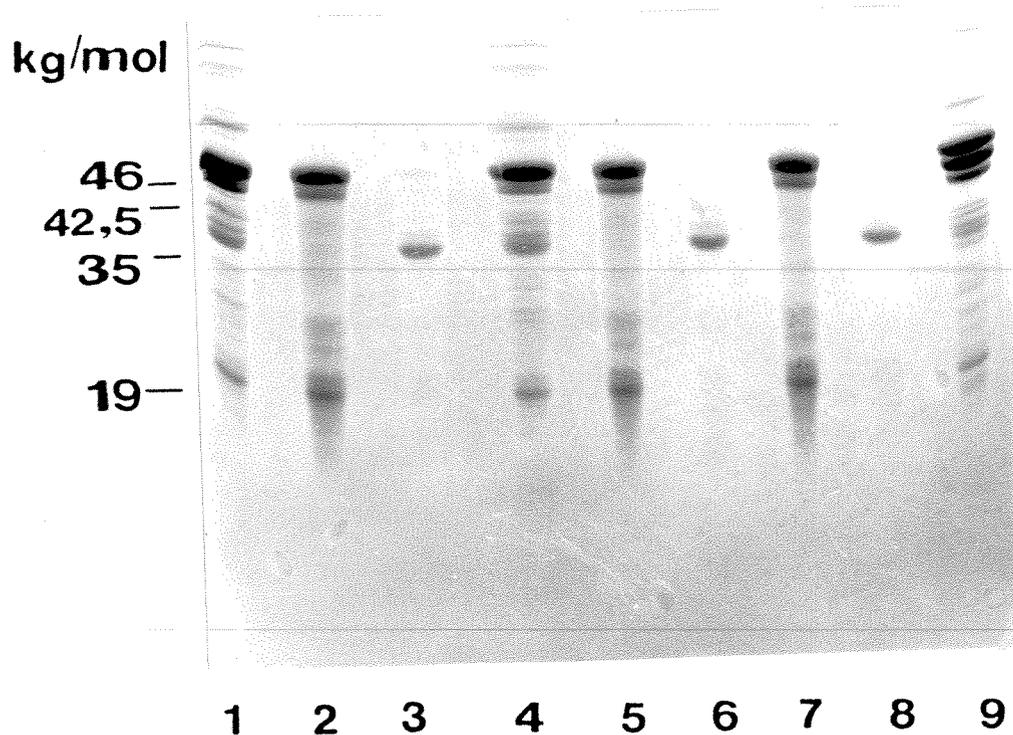


Figura 23: SDS-PAGE 13% das frações eluídas da coluna de afinidade provenientes da precipitação com 60% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$ (2, 5 e 7)- Aeté, primeira fração, eluída com pH=8, livre de lectinas. (3, 6 e 8)- Aeté, segunda fração, eluída com pH=3, constituída somente de lectinas. (1)- proteínas totais de Aeté, (9)- proteína totais de Goiano.

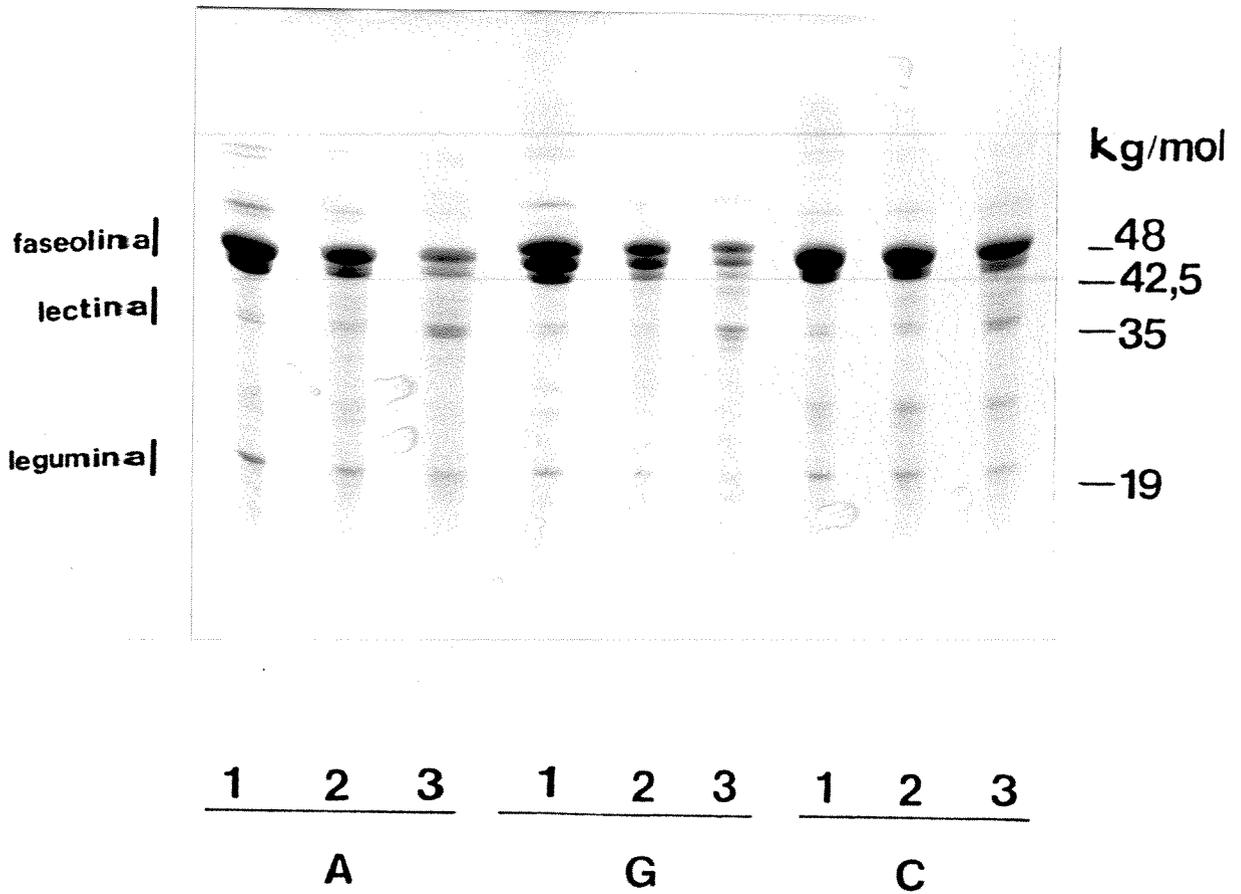


Figura 24: SDS-PAGE 13% das frações de globulina dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*, precipitadas em pH=5,5 (1), pH=4,8 (2) e pH=4 (3). A=Ateté, G=Goiano e C=Carioca.

concentrada (0,5M) (figura 22). Nos extratos provenientes da solução salina de 0,05M, somente vicilinas foram extraídas, embora parcialmente.

Esses polipeptídeos com cerca de 19 kg/mol apareceram tanto na fração albumínica (ver figura 8) quanto na globulínica (figura 12). Bandas muito fracas ao redor de 45 e 35 kg/mol, coincidentes com a faseolina e as lectinas também ocorreram, podendo representar a própria proteína ou precipitação de proteínas tipo legumina (subunidades acídicas).

O tampão acetato pH=4,8 não foi eficiente para separar vicilinas das proteínas com características de legumina, bem como cromatografia em Sephadex G-200, já que as proteínas foram eluídas num único pico.

2.2.12 Grau de Glicosilação e Conteúdo de Açúcares das Proteínas Tipo legumina

Os resultados obtidos com faseolina foram semelhantes aos das proteínas tipo legumina. Após reação com ácido periódico-reagente de Schiff em SDS-PAGE, as proteínas com características de legumina (ao redor de 19 kg/mol) se mostraram glicosiladas.

2.3 Discussão

2.3.1 Análise da Fração Globulínica

A fração globulínica é potencialmente menos tóxica, devido à menor concentração de lectinas, mas apresenta uma concentração inferior de aminoácidos sulfurados em relação às albuminas.

Quando Aeté, Goiano e Carioca são comparados com *Vicia faba* (tabela 7), observa-se que apresentam conteúdos maiores de Asx, Ala, Tyr e Lys (dobro) e concentrações menores de His, Gly, Arg, Leu e Cys (metade).

Observando-se a tabela 7, verifica-se também que muitos valores obtidos para Aeté, Goiano e Carioca foram bem próximos dos encontrados por PUSZTAI e WATT (1970). Entretanto, os cultivares estudados apresentaram concentrações maiores de Ser, Gly, Ala, Met, Lys (dobro), Pro e Cys (dobro) e uma quantidade menor de Phe.

Verifica-se ainda que os cultivares estudados apresentaram quantidades superiores de aminoácidos sulfurados, podendo chegar ao dobro como no caso de Aeté, em relação aos valores obtidos por PUSZTAI e WATT (1970). O baixo conteúdo desse aminoácido é importante do ponto de vista nutricional, já que é utilizado para biossíntese de Met, determina a estrutura e a atividade catalítica de muitas enzimas e é essencial para vários compostos que sustentam vias metabólicas [ANTUNES e SGARBIERI, 1980; SGARBIERI, 1980; ANDERSON e BEARDALL, 1991].

2.3.2 Comportamento Imunológico das Globulinas

Nos testes realizados, reações de imunodifusão revelaram que o anti-soro de proteínas totais de Goiano reconheceu a fração de proteínas totais e de faseolina de Aeté e Carioca (linha de precipitina maior e mais intensa), assim como o que se pôde detectar como lectinas, a segunda maior fração proteica desses feijões (linha de precipitina mais fraca e menor) (figuras 13 e 17). Isso sugere que, apesar de mostrarem padrões de faseolina diferentes (Goiano em relação aos demais), apresentam determinantes antigênicos comuns, indicando haver algum tipo de homologia entre eles.

2.3.3 Análise da Fração de Faseolina

A faseolina é a principal proteína da fração globulínica, pois chega a representar até 71% de toda a globulina e 53% de toda proteína (tabela 6). Goiano foi o cultivar que apresentou a maior concentração de faseolina, seguido do Carioca e do Aeté.

A estrutura da faseolina pode sofrer variações qualitativas e quantitativas, ou seja, na composição e na M.M. em subunidades entre espécies e até mesmo entre os diferentes cultivares [THOMSON *et al.*, 1978]. McLEESTER *et al* (1973), comparando proteínas de *Phaseolus vulgaris* e de *Vicia faba*, observaram que ambas as faseolinas dessas 2 espécies possuíam uma subunidade em comum de 47 kg/mol. ERICSON e CHRISPEELS (1973) constataram que *Phaseolus aureus* mostrava 4 subunidades de 63,5, 50, 29,5 e 24 kg/mol, enquanto ROMERO *et al* (1975), analisando variedades de feijão, constataram que as subunidades com ~ 53 kg/mol apresentavam M.M. total ao redor de 159 ± 24 kg/mol. BOLLINI e CHRISPEELS (1978) encontraram no cultivar "Greensleeves" 3 subunidades de faseolina na proporção de 2:2:1, cujas M.M. eram de 52, 49 e 46 kg/mol. BROWN *et al* (1980) verificaram que Tendergreen de *Phaseolus vulgaris* apresentava 3 subunidade com M.M. de 53, 47 e 43 kg/mol. LIOI (1989), analisando diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris*, observou que as subunidades de faseolina variavam entre 45 e 51 kg/mol. ESNAULT *et al* (1991) verificaram que a 7S de tremçoço possuía uma estrutura tetramérica de 168 kg/mol.

Entretanto, ainda permanecem dúvidas quanto à associação dessas subunidades que podem ser ser um trímero ou um tetrâmero. BARKER *et al* (1976) e BOLLINI e CHRISPEELS (1978) inclinaram-se primeiramente por uma estrutura heterotrimérica como passo inicial da associação dessas subunidades. Entretanto, SUN *et al* (1974) e BOLLINI e CHRISPEELS (1978) sugeriram uma estrutura tetramérica. No momento, a estrutura mais plausível, apresentada por PUSZTAI e STEWART (1980) [apud PERNOLLET e MOSSÉ, 1983], é que a faseolina é constituída por 4 subunidades que primeiramente se associam em diferentes heterotrimeros. Esses trimeros podem ser convertidos numa estrutura mais estável, um supertetrâmero,

contendo 12 subunidades.

A M.M. das subunidades da faseolina pode variar numa faixa de 63,5 a 43 kg/mol. Elas podem se associar em trímeros ou tetrâmeros, dependendo do cultivar e da espécie analisada. As faseolinas dos cultivares estudados nesse trabalho apresentaram subunidades com M.M. variando entre 48 e 41 kg/mol, constituídas de 4 subunidades (α , β , γ e δ). Baseado em PUSZTAI e STEWART (1980) [apud PERNOLLET e MOSSE, 1983], as subunidades da faseolina dos 3 cultivares estudados provavelmente se associaram numa estrutura tetramérica.

As proporções entre as subunidades da faseolina foram as mesmas para Aeté e Carioca, e diferentes em Goiano. Além disso, os cultivares estudados também foram distintos em relação ao "Processor" [SANTORO, 1988]. Sabe-se que a faseolina apresenta uma micro-heterogeneidade, no sentido de que, até o momento, a proporção das principais subunidades tem variado entre 1:1:1 e 3:3:1 [SANTORO, 1988].

Outras vicilinas também foram descritas. RACUSEN e FOOTE (1971) isolaram de feijões uma glicoproteína, responsável por 35% da proteína total da semente, com M.M. de 130 kg/mol (6,1S). PUSZTAI e WATT (1970) verificaram que as vicilinas de *Phaseolus vulgaris* possuíam M.M. de 140 kg/mol (7,6S), enquanto DERBYSHIRE *et al* (1976) encontraram vicilinas com M.M. de 151 kg/mol (6,8S), também em *Phaseolus vulgaris*. Estes resultados sugerem que a faseolina de Aeté, Goiano e Carioca, com M.M. ao redor de 175 kg/mol, seja uma proteína do tipo 7S.

2.3.4 Composição de Aminoácidos da Faseolina

Observando-se a tabela 9, verifica-se que muitos valores obtidos para os 3 cultivares estudados foram próximos dos obtidos por outros autores [BARKER *et al*, 1976; MA e BLISS, 1978].

Quando comparados com os resultados de BARKER *et al* (1976), os cultivares estudados mostraram quantidades maiores de Lys e menores de Ile e Leu. Entretanto, Aeté, Goiano e Carioca apresentaram concentrações maiores de Ser, Gly, Ala, Lys e Pro e concentrações menores de Glx, His, Arg, Ile e Leu em relação aos valores obtidos por MA e BLISS (1978).

Embora todos os cultivares exibam conteúdos de Cys muito próximos, Aeté, Goiano e Carioca apresentaram quantidades maiores de aminoácidos sulfurados em relação aos dos outros analisados pelos outros autores, apesar de ainda serem deficientes nestes aminoácidos quando comparados com o padrão da F.A.O. (1971).

Porém, todos os aminoácidos considerados essenciais por essa organização estão em concentrações iguais ou superiores aos valores padrões numa proteína ideal numa alimentação, estabelecidos por ela ¹.

¹A concentração (%) ideal de aminoácidos essenciais numa proteína alimentar humana dada pela F.A.O. é: Thr=4, Tyr+Phe=6, Val=5, Met+Cys=3,5, Ile=4, Leu=7 e Lys=5,5.

Desse modo, os cultivares estudados são materiais muito bons numa alimentação complementada por cereais e para cruzamentos genéticos, que visem o aumento da concentração desses aminoácidos na semente.

2.3.5 Reação de Degradação Enzimática da Faseolina

Faseolina foi prontamente degradada pela tripsina, formando polipeptídeos ao redor de 20 kg/mol em SDS-PAGE, semelhante aos resultados obtidos por ROMERO *et al* (1975), DESHPANDE e NIELSEN (1987b), NIELSEN (1988) e DESHPANDE e DAMODARAN (1989). Todavia, esses polipeptídeos não sofreram degradação posterior, mesmo após 2h de reação (figuras 18, 19 e 20). Os sítios passivos de serem quebrados pela tripsina estariam em número pequeno e próximos ao centro da cadeia polipeptídica, já que outras enzimas também atuam nesse local [DESHPANDE e NIELSEN, 1987a; SANTORO, 1988] A porção central da molécula parece ser o sítio preferido durante os estágios iniciais da hidrólise triptica [DESHPANDE e NIELSEN, 1987a].

É conhecido da literatura que se a proteína nativa for denaturada pelo calor (100°C), quando reagir com a enzima, formará polipeptídeos com M.M. abaixo de 20 kg/mol, sofrendo hidrólise total. O calor age na promoção da desestabilização da estrutura da faseolina, expondo os sítios de afinidade com a enzima, facilitando seu ataque. Tal evento influencia a degradação da faseolina, pois em seu estado nativo dificilmente ela sofre ação das endopeptidases até hidrólise completa [ROMERO *et al*, 1975; THOMSON e LIENER, 1980 apud DESHPANDE e NIELSEN, 1987a].

A formação de polipeptídeos com M.M. ao redor de 20 kg/mol resultante da degradação das subunidades da faseolina parece ser uma característica geral de leguminosas, embora haja poucos trabalhos em relação à quantidade de espécies existentes. Esse tipo de estudo é bastante válido para a análise da estrutura terciária dessa proteína do ponto de vista dos efeitos tóxicos que apresenta, semelhantes a o das lectinas. Foi mostrado que a faseolina nativa é um estimulante de secreção endógena excessiva de nitrogênio, que passa a ser eliminado pelas fezes, provocando perda de peso do animal, podendo levá-lo à morte. Além disso, quando essa proteína é degradada no intestino, forma fragmentos que são tão ou mais tóxicos quanto a faseolina nativa, pois, quando degradados, podem se aderir mais facilmente ao intestino. O problema surge, então, quando esses grãos são utilizados crus por exemplo para a fabricação de ração animal [SANTORO, 1988; SANTORO *et al*, 1988].

A subunidade α foi a primeira a ser degradada nos 3 cultivares. Houve, entretanto, uma leve alteração na mobilidade dessa subunidade em Goiano (figura 19), indicando que alguns aminoácidos (resíduos) foram subtraídos da cadeia polipeptídica nativa, provavelmente do C-terminal da molécula, onde devem existir sítios de ligação para a tripsina. Isto também é suportado pela incapacidade de ação das aminopeptidases sobre a faseolina nativa que, além disso, não é pronta-

mente acessível ao seqüenciamento [DESHPANDE e NIELSEN, 1987a; NIELSEN, 1988].

Observando os géis de eletroforese (figuras 18, 19 e 20), verifica-se que houve um decréscimo de densidade de cor, diferente em cada subunidade da faseolina. Houve um completo desaparecimento das mesmas entre 1 e 5 minutos, indicando que todas as subunidades continham sítios de clivagem para tripsina e que a reação de hidrólise é relativamente lenta e a proteína não é degradada de uma só vez.

A faseolina de Goiano foi a mais resistente frente à tripsina. Isso indica que os sítios para ação da enzima estariam localizados diferentemente na proteína de Goiano em relação aos de Aeté e Carioca. Nesses 2 cultivares, os principais sítios de clivagem estariam numa região estendida de aminoácidos hidrofílicos que ocorreriam na superfície proteica, sendo mais acessíveis à endopeptidase.

O fato de serem glicosiladas não interferiu na susceptibilidade da enzima à proteína, pois a faseolina de Carioca que exibiu o maior conteúdo de carboidratos foi mais rapidamente degradada do que a de Goiano, com menor grau de glicosilação. Esses resultados discordam dos dados obtidos por ROMERO e RYAN (1978), que propuseram que as ligações glicídicas tornariam a faseolina mais resistente ao ataque proteolítico. No presente caso, as cadeias de carboidratos não devem ter interferido na geometria dos sítios para a ligação com a tripsina.

A análise de mapeamento triptico, utilizando fórmulas para cálculos de grau de homologia, é de grande utilidade para muitos materiais [ANDREWS, 1991]. Entretanto, é preciso estar atento com relação à degradação das proteínas pelas endopeptidases, uma vez que os padrões de polipeptídeos formados podem variar em função do tempo de reação, o que ocorreu com os cultivares estudados (figuras 18, 19 e 20). É preciso estabelecer o ponto da cinética enzimática que deve ser considerado para se determinar o grau de homologia entre as proteínas resistentes à degradação completa.

2.3.6 Grau de Glicosilação e Conteúdo de Carboidratos da Faseolina

Aeté, Goiano e Carioca mostraram ser cultivares com concentração de açúcares ligados à faseolina um pouco mais elevada do que aquela mencionada por RACUSEN e FOOTE (1971) (4,5%) e DERBYSHIRE *et al* (1976) (5,5%), porém, próxima à obtida no cultivar "Red kidney bean", com 6,8% de carboidratos na faseolina [AHN *et al.*, 1990]. Carioca foi o que apresentou a maior concentração de açúcares, aproximadamente o dobro dos outros 2 cultivares. Isso mostra o diferente grau de glicosilação de cada proteína, que depende do cultivar.

Em reação com ácido periódico-Schiff, comprovou-se que todas as subunidades estavam glicosiladas. Isso concorda com os resultados de HALL *et al* (1977) que

constatarem que a faseolina é uma glicoproteína, pois após eletroforese e coloração com Schiff, todos os seus polipeptídeos ficaram corados, mostrando que possuíam açúcares associados. BROWN *et al* (1980) obtiveram resultados semelhantes trabalhando com feijão comum. BERNARDI *et al* (1990) também verificaram que as vicilinas de *Phaseolus coccineus* estavam glicosiladas, porém a menor subunidade da faseolina foi muito pouco ou nada glicosilada. MA *et al* (1980) e PAAREN *et al* (1987) mencionam que análises de SDS-PAGE de produtos deglicosilados mostraram que a glicosilação diferencial é responsável por grande parte da heterogeneidade de M.M., observada entre os polipeptídeos de faseolina.

2.3.7 Separação de Proteínas Tipo legumina e de Vicilinas e Avaliação de suas Faixas de Precipitação

Através de precipitação zonal não foi possível separar as proteínas com características de legumina das vicilinas, já que ambas foram eluídas juntas.

Isso ocorreu não só devido à baixa concentração de proteínas tipo legumina, mas também devido à ampla heterogeneidade de carga demonstrada por essas proteínas (além das lectinas) desses cultivares que precipitaram numa faixa de pH que variou de 5,5 a 4. Praticamente toda a proteína foi precipitada em pH=5,5, porém, o material proteico precipitado em pH=4,8 e 4, quando analisado em SDS-PAGE, foi idêntico ao de 5,5.

Algumas suposições podem ser feitas com relação a esses polipeptídeos precipitados que coincidem com as subunidades de faseolina e com as de lectinas (~35 kg/mol), além de se verificar a presença das proteínas tipo legumina (~20 kg/mol).

Os polipeptídeos com M.M. em torno de 45 kg/mol poderiam ser considerados como subunidades ácidas das leguminas. Entretanto, a fração solúvel proveniente da precipitação com 60% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$ ao ser eluído em coluna de afinidade, e submetido à imunodifusão dupla, revelou somente faseolina pura. A precipitação com saturação a 40 e 60% com $(NH_4)_2SO_4$ pode ter separado também as subunidades ácidas da proteína tipo legumina (figura 14), já que as básicas permanecem nessa fração [WRIGHT e BOULTER, 1974; MORI e UTSUMI, 1979; DERBYSHIRE e BOULTER, 1976].

As bandas com M.M. de 35 kg/mol poderiam também ser consideradas como as subunidades ácidas da proteína tipo legumina, e estariam se sobrepondo às lectinas. Contudo, comprovou-se que esses polipeptídeos não são subunidades ácidas de leguminas, pois a fração precipitada com saturação a 60% com $(NH_4)_2SO_4$, que contém grandes quantidades de polipeptídeos ao redor de 35kg/mol, foi eluída em coluna de afinidade e o material coletado submetido à SDS-PAGE. Esse procedimento mostrou que os polipeptídeos dessa faixa eram realmente lectinas, já que se ligavam à fetuína (figura 23). Desse modo, esses cultivares contêm lectinas que apre-

sentam uma grande heterogeneidade de carga, à semelhança de *Phaseolus coccineus* [BERNARDI *et al.*, 1990].

Quanto aos polipeptídeos com M.M. com cerca de 20 kg/mol, vários indícios sugeriram que seriam realmente leguminas. O primeiro deles foi a própria M.M. As leguminas apresentam uma mobilidade eletroforética muito maior do que as vicilinas, que, todavia, pode ser alterada pela presença de pontes dissulfeto [SHOLZ *et al.*, 1974; GRIFFITH, 1972 apud WRIGHT e BOULTER, 1974]. Por exemplo, as subunidades básicas de *Vicia faba* podem mostrar M.M. de 23, 20,5 e 19 kg/mol [MORI e UTSUMI, 1979], ou mesmo 23,8, 20,9 e 20,1 kg/mol [WRIGHT e BOULTER, 1974].

Uma outra evidência foi o fato de terem sido extraídas somente com soluções de NaCl mais concentradas, concordando com DERBYSHIRE *et al.* (1976) e SUCHKOV *et al.* (1990). Além disso, essas bandas foram precipitadas na fração de $(NH_4)_2SO_4$ 60%, como ocorreu, por exemplo, com *Vicia faba* [DERBYSHIRE e BOULTER, 1976].

2.3.8 Grau de Glicosilação das Proteínas Tipo legumina

Uma controvérsia, entretanto, permanece ainda com relação à glicosilação das leguminas. Alguns autores [DAVEY e DUDMAN, 1979 apud HURKMAN e BEEVERS, 1980; DURANTI *et al.*, 1990] citam exemplos de materiais onde a legumina é glicosilada, diferentemente do que é exposto na clássica revisão de DERBYSHIRE *et al.* (1976). Segundo estes autores, as leguminas apresentam ao redor de 1-2% de carboidratos ligados a sua estrutura, como é o caso de *Phaseolus vulgaris* [DURANTI *et al.*, 1990].

Essa questão decorre do modo pelo qual a legumina é extraída. Quando essa proteína foi extraída segundo o procedimento de DANIELSSON (1949) [apud HURKMAN e BEEVERS, 1980], que utiliza extração com soluções salinas, precipitação a 70% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$ e diálise, apresentou-se glicosilada, mesmo quando separada de vicilina através de precipitação (iso)elétrica zonal a partir de corpos proteicos [DAVEY e DUDMAN, (1979) apud HURKMAN e BEEVERS, 1980]. Contudo, quando se usou precipitação isoelétrica zonal e a proteína foi purificada em cromatografia DEAE-celulose e centrifugação em gradiente de sacarose ou utilizando cromatografia de hidroxiapatita, as leguminas recuperadas nesse processo não se apresentavam glicosiladas [THOMSON *et al.*, 1978; CASEY (1979) e GATEHOUSE *et al.*, 1980 apud HURKMAN e BEEVERS, 1980].

Observando-se a tabela 10, constata-se que o componente proteico glicosilado de Casey corresponde a uma das frações de legumina de Danielsson. Além disso, verifica-se que todo componente glicosilado foi precipitado com 40% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$, e estavam associados a polipeptídeos de M.M. ao redor de 15 kg/mol. Quando as leguminas eram preparadas pelo método de Danielsson, e a

Tabela 10: Diferentes frações proteicas obtidas nos procedimentos de Danielsson e de Casey [extraídos de HURKMAN e BEEVERS (1980)] para separar legumina de vicilina e analisar seu grau de glicosilação. A % refere-se à saturação com $(NH_4)_2SO_4$.

MÉTODO	FRAÇÃO	OBSERVAÇÕES	RESULTADO
Danielsson	40-70%	vicilinas	glicosilada
	0-40%	leguminas	glicosilada
Casey	40-75%	mais solúvel	-
	0-40%	descartada	componente proteico glicosilado

fração precipitada a 40% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$ descartada, o polipeptídeo padrão era semelhante àquela legumina isolada pelo método de Casey.

Esses resultados indicaram que os corpos proteicos contêm uma glicoproteína tipo legumina que é isolada pelo método de Danielsson, mas é descartada por outros métodos de isolamento.

Sempre houve dificuldades em separar leguminas de vicilinas, mesmo quando se utilizam vários métodos (cromatografia, diálise, precipitações e solubilidades diferenciais), principalmente se as leguminas estão presentes em baixíssimas quantidades. Essa separação exige qualidade e exaustão dos métodos, e muita precisão no que diz respeito ao controle do pH, da precipitação e da centrifugação [SCHOLZ *et al.*, 1974]. Esse último autor, por exemplo, não conseguiu separar leguminas de vicilinas em *Vicia faba*, a não ser por métodos serológicos, e nesse caso, essas proteínas foram antigenicamente distintas. Estes métodos são muito eficientes, porém os resultados algumas vezes podem ser surpreendentes, pois um anti-soro contra legumina pode apresentar determinantes antigênicos comuns para legumina e vicilina até mesmo entre espécies diferentes [DUDMAN e MILLERD, 1975].

2.3.9 Aspectos Filogenéticos

Os 3 padrões T, S e C são altamente representativos da variabilidade da fração de faseolina em *Phaseolus vulgaris*. Quase todas as sementes analisadas por LIOI (1989) podem ser classificadas em um dos 3 padrões mencionados.

O padrão tipo C é resultante do cruzamento de T com S e provavelmente teve origem no mesmo local onde T predominava. Desse modo, as características de T prevalecem no padrão tipo C [GEPTS e BLISS, 1986].

Contender mostra uma baixa frequência dentre os cultivares de feijão, mas é amplamente espalhado no Mediterrâneo onde atualmente representa o tipo de maior ocorrência. Isso pode ser resultado de um clima peculiar e de práticas agrícolas da

área que favoreceram uma diversificação típica de colheita com alta frequência de características que eram raras na área original [VAVILOV, 1951 apud LIOI, 1989].

Baseando-se nas principais características desses padrões com relação à faseolina, Aeté e Carioca se aproximaram mais do padrão tipo Sanilac e Goiano do padrão tipo Contender.

Além disso, a heterogeneidade nesses 3 padrões ocorre em nível morfológico, onde o tamanho da semente varia conforme o padrão [GEPTS e BLISS, 1986] (tabela 11). Os cultivares estudados também foram medidos e classificados como o que foi feito com relação à faseolina.

Tabela 11: Média e desvio padrão^a das dimensões (cm) de sementes dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris* estudados e das sementes dos cultivares com os principais padrões de faseolina [extraído de GEPTS e BLISS, 1986].

	Altura	Largura	Circunferência
AET	0,98±0,07	0,63±0,04	1,9±0,1
GO	1,11±0,05	0,76±0,04	2,5±0,1
CAR	1,05±0,09	0,67±0,04	2,1±0,2
"T"	1,4	0,83	1,9
"C"	1,17	0,78	2,1
"S"	1,0	0,65	1,4

^aNúmero da amostra (n)=50

Observando-se a tabela, verifica-se que Goiano apresenta sementes maiores que Aeté e Carioca, semelhante ao ocorrido com os padrões tipo C em relação ao tipo S, sustentando a classificação anteriormente feita com relação à faseolina.

Aeté e Carioca apresentam características que indicam um certo grau de homologia entre eles, distanciando-se de Goiano. Aeté e Carioca apresentaram padrões eletroforéticos das proteínas totais (o que inclui a faseolina) praticamente idênticos e foram muito semelhantes quanto ao tamanho da semente e ao conteúdo da maioria das frações proteicas. As pequenas diferenças entre ambos ocorreram na concentração de alguns aminoácidos e, numa maior extensão, na concentração de açúcares ligados à faseolina. O padrão, o grau de resistência à degradação enzimática e o mapeamento tríptico da faseolina também foram análogos, o que indica que, devido à grande semelhança dos fragmentos produzidos nessa reação, há uma grande probabilidade de que a faseolina desses 2 cultivares apresente uma homologia muito alta e, conseqüentemente, uma grande chance de essas proteínas serem iguais.

2.4 Conclusões

1. Embora Aeté tenha mostrado o maior conteúdo de Met e Cys e Carioca a maior quantidade de Lys, Goiano pareceu ser o cultivar potencialmente mais nutritivo, pois foi o que conteve a menor concentração de lectinas-globulinas.
2. O conteúdo de açúcares ligados à faseolina também variou nos cultivares estudados. Carioca foi o que exibiu o maior conteúdo de carboidratos, seguido de Goiano e Aeté. Todas as subunidades da faseolina mostraram-se glicosiladas embora, o grau de glicosilação tenha se distribuído indistintamente nas diferentes subunidades desta proteína.
3. Os polipeptídeos resultantes da degradação da faseolina por endopeptidases foram semelhantes nos cultivares estudados. As diferenças foram suficientes para se identificar um certo grau de homologia entre eles. Esses cultivares também são resistentes à degradação completa por endopeptidases de maneira semelhante a outros cultivares já estudados.
4. Faseolina, lectina e proteínas com características de legumina apresentaram uma grande heterogeneidade de carga, pois precipitaram numa ampla faixa de pH, fato que explicaria a dificuldade de identificação de leguminas através de métodos convencionais.
5. Até onde foi possível a identificação das leguminas, estas se apresentaram glicosiladas.

Conclusões Gerais

1. Os cultivares estudados apresentaram concentrações inferiores de albumina em relação a outros materiais analisados por outros autores. Além disso, a fração de albuminas dos 3 cultivares apresentou uma concentração maior de lectinas do que a fração correspondente de globulinas. O cultivar Aeté exibiu uma quantidade maior de lectinas do que Goiano.
2. Aeté e Carioca apresentaram uma variação na proporção entre as subunidades da faseolina, diferente da encontrada em Goiano e em outros materiais analisados por outros autores.
3. Os padrões e a alta resistência da faseolina à degradação por endopeptidases nos 3 cultivares são semelhantes àqueles conhecidos em outras leguminosas.
4. O estudo do padrão de faseolina, obtido por SDS-PAGE e complementado com mapeamento tríptico, forneceu informações valiosas sobre aspectos filogenéticos dos cultivares de feijões estudados.
5. Através da metodologia empregada, o cultivar Goiano é filogeneticamente diferente de Aeté e Carioca que apresentam características que indicam um certo grau de homologia entre os mesmos.
6. Aeté, Goiano e Carioca são excelentes materiais numa alimentação complementada por cereais devido às altas concentrações de Lys e quantidades maiores de aminoácidos sulfurados em relação à outros materiais.

Referências Bibliográficas

- AHN, J.K., SEN, L.C. e WHITAKER, J.R. 1990. Stability of tertiary structure of phaseolin of red Kidney bean *Phaseolus vulgaris* as limiting factor in proteolysis. *J. Food Biochem.*15:263-278
- ALMEIDA, N.G., BARCA, A.M.C. e VALENCIA, M.E. 1991. Effect of different heat treatments on the antinutricional activity of *Phaseolus vulgaris* (variety Ojo de Cabra) lectin. *J. Agric. Food Chem.* 39:1627-1630
- ANDERSON, J.W. e BEARDALL, J. 1991. *In: Molecular activities of plant cells.* Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 230-241.
- ANDREWS, A. T. 1991. Peptide mapping. *In: Gel electrophoresis of proteins.* B.D. Hames e D., Rickwood (Eds.) Oxford University Press, Oxford. pp.301-319
- ANTUNES, P.L. e SGARBIERI, V.C. 1980. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 28:935-938
- BARKER, R.D.J., DERBYSHIRE, E., YARWOOD, A. e BOULTER, D. 1976. Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. *Phytochemistry* 15:751-757
- BARRATT, D.P.H. 1980. Cultivar identification of *Vicia faba* (L.) by sodium-dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis of seed globulins. *J. Sci. Food Agric.* 31:813-819
- BERNARDI, R., LUPI, M.C. e DURANTE, M. 1990. *Phaseolus coccinius* L. Storage proteins. Extraction and characterization. *Biol. Plant.* (PRAHA) 32(3):198-204
- BENSON, J.R. e HARE, P.E. 1975. o-Phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary

- amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:619
- BIETZ, J.A. 1979. Recent Advances in the Isolation and Characterization of Cereal Proteins. *Cereal Foods World*. 24:199-207
- BLAGROVE, R.J., LILLEY, G.G. e DAVEY, R. 1980. Molecular Weight of legumin from *Pisum sativum*. *Austr. J. Plant Physiol.* 7(3):221-225
- BOLLINI, R. e CHRISPEELS, M.J. 1978. Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 142:291-298
- BOLLINI, R. e VITALE, A. 1981. Genetic variability in charge microheterogeneity and polypeptide composition of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris*; and peptide maps of its three major subunits. *Physiol. Plant* 52:96-100
- BOULTER, D. e DERBYSHIRE, E. 1971. Taxonomic aspects of the structure of legume proteins. In: Chemotaxonomy of the Leguminosae. J.B. Harborne, D. Boulter e B.L. Turner (Eds.) Academic Press. London. pp. 285-308 (Cap. 8)
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- BROWN, J.W.S., BLISS, F.A. e HALL, T.C. 1980. Microheterogeneity of globulin-1 storage protein from French bean with isoelectrofocusing. *Plant Physiol.* 66:838-840
- BROWN, J.W.S., MA, Y., BLISS, F.A. e HALL, T.C. 1981a. Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of French bean. *Theor. Appl. Genet.* 59:83-88
- BROWN, J.W.S., OSBORN, T.C., BLISS, F.A. e Hall, T.C. 1981b. Genetic variation in the subunits of globulin-2 and albumin seed proteins of French bean. *Theor. Appl. Genet.* 60:245-250
- BROWN, J.W.S., OSBORN, T.C., BLISS, S.A. e HALL, T.C. 1982. Bean lectins-part 1 -Relationships between agglutinating activity and electrophoretic variation in the lectin-containing G2/albumin seed protein of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 62:263-271
- CHAMBERS, S.J., CARR, H.J., PLUMB, G.W. e LAMBERT, N. 1990. The problem of refolding and reassembling recombinant vicilin subunits. *J. Sci. food Agric.*

52:107-118

- CHRISTIE, D.L. e PALMER, D.J. 1990. Identification and characterization of glycoproteins after extraction of bovine chromaffin-granule membranes with lithium di-iodosalicylate *Biochem. J.* 270:57-61
- CROCOMO, O.J. 1985. Biossítese de proteínas. *In: Fisiologia Vegetal (Vol.1)*, FERRI, M. (Coord.) Edit. Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo, pp.303-316
- DANIELSON, C.E. 1956. Plant protein. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 7:215-236
- DERBYSHIRE, E. e BOULTER, D. 1976. Isolation of legumin-like protein from *Phaseolus aureus* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 15:411-414
- DERBYSHIRE, E., WRIGHT, D.J. e BOULTER, D. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds - Review. *Phytochemistry* 15:3-24
- DESHPANDE, S.S. e DAMODARAN, S. 1989. Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. *J. Food Sci.* 54(1):108-113
- DESHPANDE, S.S. e NIELSEN, S.S. 1987a. *In vitro* enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Food Sci.* 52(5):1326-1329
- DESHPANDE S.S. e NIELSEN, S.S. 1987b. *In vitro* digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: The role of heat-stable protease inhibitors. *J. Food Sci.* 52(5) 1330-34
- DOERNER, K.C. e WHITE, B.A. 1990. Detection of glycoproteins separated by non-denaturing polyacrilamide gel electrophoresis using the periodic acid-schiff stain. *Anal. Biochem.* 187:147-150
- DOUCET, J-P, MURPHY, B.J. e TUANA, B.S. 1990. Modification of a discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel system for minigel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 190:209-211
- DUDMAN, W.F. e MILLERD, A. 1975. Immunochemical behavior of legumin and vicilin from *Vicia faba*: a survey of related proteins in the leguminosae subfamily faboideae. *Biochem. System. Ecol.* 3:25-33
- DURANTI, M., GORINSTEIN, S. e CERLETTI, P. 1990. Rapid separation and detection of concanavalin a reacting glycoproteins: application to storage proteins of a legume seed. *J. Food Biochem.* 14:327-30
- ERICSON, H.C. e CHRISPEELS, M.J. 1973. Isolation and characterization of glucosamine-

- containing storage glycoproteins from the cotyledons of *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.* 52:98-104
- ERSLAND, D.R., GATEHOUSE, J.A., TYLLER, M. e BOULTER, D. 1983. The storage proteins of *Phaseolus vulgaris*, L. *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. In: Seed proteins, biochemistry, genetics, nutritive value. W. Gottschalk e H.P. Muller (Eds.) Bonn, pp. 46-75
- ESNAULT, M.A. MERCEUR, A. e CITHAREL, J. 1991. Characterization of globulins of yellow lupin seeds. *Plant Physiol.* 29(6):573-583
- F.A.O. 1957. "Protein requirements" FAO nutritional studies nº 16. FAO, Rome, Italy.
- FARFÁN, J.A. 1990. In: Química de proteínas. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 134p.
- FRAME, R., WHEELER, C.T., BOWES, B.G. e STERWART-TULL, D.E.S. 1976. The distribution of the protein phaseolin in the intact plant and cultured tissues of *Phaseolus vulgaris* L. *New Phytol.* 77:25-28
- GEPTS, P. e BLISS, F.A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* 40(4) 469-478
- GEPTS, P., OSBORN, T.C., RASHKA, K. e BLISS, F.A. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40(4):451-468
- GOMES, F.P. 1976. In: Curso de estatística experimental. Livraria Nobel S.A., Piracicaba, pp. 38-40.
- GRINBERG, V.Y., DANILENKO, A.N., BUROVA, T.V. e TOLSTOGUZOV, V.B. 1989. Conformational stability of 11S globulins from seeds. *J. Sci. Food Agric.* 49:235-248
- HALL, T.C., McLEESTER, R.C. e BLISS, F.A. 1977. Equal expression of the maternal and paternal alleles for the polypeptide subunits of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 59:1122-1124
- HORSTMANN, C. 1983. Specific subunit pairs of legumin from *Vicia faba*. *Phytochemistry* 22(9):1861-1866
- HURKMAN, W.J. e BEEVERS, L. 1980. What is pea legumin - is it glycosylated? *Planta* 150:82-88

- JARRET, H.W., COOKSG, K.D., ELLIS, B. e ANDERSON, J.M. 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. *Anal. Biochem.* 153:189-198
- JERMYN, M.A. 1975. Precipitation reactions between components of plant tissue extracts. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:533-42
- KAWASAKI, H. e SUZUKI, K. 1990. Separation of peptides dissolved in a sodium dodecyl sulfate solution by reversed-phase liquid chromatography: removal of sodium dodecyl sulfate from peptides using a ion-exchange precolumn. *Anal. Biochem.* 186:264-268
- KOENIG, R.L., SINGH, S.P. e GEPTS, P. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 44(1):50-60
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- LARKINS, B.A. 1981. Seed Protein: Characterization and Biosynthesis. *In: The Biochemistry of Plants; Proteins and Nucleic Acids.* A. Marcus (Ed.) Academic Press, New York. pp. 449-489
- LIENER, I.E. 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility - a review. *J. Food Sci.* 41:1076-1081
- LIOI, L. 1989. Geographical variation of phaseolin patterns in an old world collection of *Phaseolus vulgaris*. *Seed Sci. Technol.* 17:317-324
- LUMEN, B.O. De 1990. Molecular approaches to improving the nutritional and functional properties of plant seeds as food sources: developments and comments. *J. Agric. Food Chem.* 38(9):1779-1788
- MA, Y. e BLISS, F.A. 1978. Seed proteins of common bean. *Crop. Sci.* 18:431-437
- MA, Y., BLISS, F.A. e HALL, T.C. 1980. Peptide mapping reveals considerable sequence homology among the three polypeptide subunits of G1 storage protein from French bean seed. *Plant Physiol.* 66:897-902
- MANEN, J.F. e MIÈGE, M-N. 1977. Purification et caractérisation des lectines isolées dans les albumines et les globulines de *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Vég.* 15(1):163-173
- MAXIMOV, N.A. 1938. Reserve proteins and products of their hydrolytic decomposition. *In: Plant Physiology.* McGraw Hill Publications in the Botanical Sciences.

New York, pp. 50-61.

- MEJIA, E.G., HANKINS, C.N. e PAREDES-LOPEZ, L.M. 1990. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J. Food Biochem.* 14:117-126
- McLEESTER, R.C. , HALL, T.C., SUN, S.M. e BLISS, F.A. 1973. Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. *Phytochemistry* 2:85-93
- MORI, T. e UTSUMI, S. 1979. Purification and properties of storage proteins of broad bean. *Agric. Biol. Chem.* 43(3):577-583
- MOORE, S. 1963. On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol Chem.* 238:235-237
- NÄSHOLM, T., SANDBERG, G. e ERCSSON, A. 1987. Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethylchloroformate derivatives. *J. Chromatogr.* 396:225-236
- NIELSEN, S.S. 1988. Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteases - a review. *Cereal Chem.* 65(5):435-442
- ORTEGA, M., SANCHEZ, C., CHACON, E., RENDOM, J.L., ESTRADA, R., MASO, F., MONTANO, L.F. e ZENTENO, E. 1990. Purification and characterization of a lectin from *Erythrina americana* by affinity chromatography. *Plant Sci.* 72:133-140
- OUCHTERLONY, O. 1949. Antigen-antobody reaction in gel. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 26:507-515
- OSBORN, T.C., BUROW, M. e BLISS, F.A. 1987. Purification and characterization of arcelin seed protein from common bean. *Plant Physiol.* 86:399-405
- PAAREN, H.C., SLIGHTOM, J. L., HALL, T.C., INGLIS, A.S. e BLAGROVE, R.L. 1987. Purification of a seed glycoprotein: N-terminal end deglycosylation analysis of Phaseolin. *Phytochemistry* 26:335-343
- PALMER, R., McINTOSH, A. e PUSZTAI, A. 1973. The nutritional evaluation of Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). The effect on nutritional value of seed germination and changes in trypsin inhibitor content. *J. Sci. Food Agric.* 24:937-944
- PAYNE, P.I., 1983. Breeding for protein quantity and protein quality in seed crops. *In:*

- Seed proteins. J. Daussant, J. Mossé e J. Vaughan (Eds.) Academic Press, London. pp.223-253
- PASQUALINI, S., LLUNCH, C. e ANTONIELLI, M. 1991. Seed storage proteins in several genetic lines of *Vicia faba*. *Plant Physiol. Biochem.* 29(5):507-515
- PERNOLLET, J.C. e MOSSÉ, J. 1983. Structure and Location of legume and cereal seed storage proteins. *In: Seed proteins. J. Daussant, J., Mossé e J. Vaughan (Eds.) Academic Press, London. pp.155-191*
- PETERS Jr., T. 1975. Serum albumin *In: The plasm protein. (vol. 1) F.W. Putnam (Ed.) Academic Press, New York, p.141*
- PRZYBYLSKA, J., HURICH, J. e ZIMINIAK-PRZYBYLSKA, Z. 1979. Comparative study of seed proteins in the genus *Pisum* IV -electrophoretic patterns of legumin and vicilin components. *Genet. Pol.* 20(4):517-528
- PUSZTAI, A. e WATT, W.B. 1970. Glycoprotein-II. The isolation of a major antigenic and non haemagglutinating glycoprotein from *Phaseolus vulgaris* *Biochim. Biophys. Acta* 207:413-431
- PUSZTAI, A. e WATT, W.B. 1974. Isolectins of *Phaseolus vulgaris* - a comprehensive study of fractionation. *Biochim. Biophys. Acta* 365:57-71
- PUSZTAI, A. e PALMER, R. 1977. Nutricional evaluation of Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the toxic principle. *J. Sci. Food Agric.* 28:620- 623
- PUSZTAI, A., CLARKE, E.M.W., KING, T.P. e STEWART, J.C. 1979. Nutricional evaluation of Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): chemical composition, lectin content and nutricional value of selected cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 30:843-848
- PUSZTAI, A., CROY, R.R.D., GRANT, G. e STEWART, J.C. 1983. Seed lectins: distribution, location and biological role.*In: Seed protein. J. Daussant, J. Mossé e J. Vaughan (Eds.) Academic Press, London. pp.53-82*
- RACUSEN, D. e FOOTE, M. 1971. The major glycoprotein in germinating bean seeds. *Can. J. Bot.* 49:2107-2111
- ROMERO, J. e RYAN, D.S. 1978. Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L., to *in vitro* enzymatic hidrolisis. *J. Agric. Food Chem.* 26(4):784-788
- ROMERO, J., SUN, S.M., McLEESTER, R.C., BLISS, F.A. e HALL, T.C. 1975. Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean,

Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol.* 56:776-779

- SAKAKIBARA, M., AOKI, T. e NOGUCHI, H. 1979. Isolation and characterization of 7S protein-I of *Phaseolus vulgaris* (Adzuki bean) *Agric. Biol. Chem.* 43(9):1951-1957
- SANTORO, L.G. 1988. Nutricional utilization by monogastric animals of glicoprotein II (Phaseolin), the major 7S protein from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *In vivo e in vitro* degradation of glicoprotein II by rat intestinal proteases. Tese de doutorado. Universidade de Aberdeen, Escócia.
- SANTORO, L.G., GRANT, G. e PUSZTAI, A. 1988. Degradation of glicoprotein II (phaseolin), the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* seeds. *In: Recent advances of research in antinutricional factors in legume seeds.* Eds. Huisman, J., Poel, T.F.B. van der, Liener I.E. Pudoc Wageningen. The Netherlands, pp.363-367
- SCHOLZ, G., RICHTER, J. e MANTEUFFEL, R. 1974. Studies on seed globulins from legumes I- Separation and purification of legumin and vicilin from *Vicia faba* L. by zone precipitation. *Biochem Physiol. Pflanzen* 166:163-172
- SGARBIERI, V.C. 1980. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família Leguminosae. *Ciênc. Cult.* 32(1):78-84
- SGARBIERI, V.C. e GARRUTI, R.S. 1986. A review of some factors affecting the availability and the nutritional and technological quality of common dry beans, a dietary stable in Brazil. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 19:202-209
- SGARBIERI, V.C., ANTUNES, P.C. e ALMEIDA, L.D. 1979. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) *J. Food Sci.* 6:1306-1308
- SHARON, N. e LIS, H. 1990. Legume lectins-a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4:3198-3208
- SHEIN, C.H. 1990. Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Biotechnology* 8:308-317
- SOUZA, N. e OLIVEIRA, J.E.D. de. 1969. Estudo experimental sobre o valor nutritivo de misturas de arooz e feijão. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.* 2(3):175-180
- STEGEMANN, H. e PIETSCH, G. 1983. Methods for Characterization of the Seed Proteins in Cereals and Legumes. *In: Seed proteins, biochemistry, genetics, nutritive value.* W. Gottschalk e H.P. Muller (Eds.) Bonn, pp. 46-75

- STRYER, L. 1982. *In: Bioquímica*, Edit. Revert, S.A., Barcelona, pp.15-42
- SUCHKOV, V.V., POPELLO, I.A., GRINBERG, V.Y. e TOLSTOGUSOV, V.B. 1990. Isolation and purification of 7S and 11S globulins from Broad beans and peas. *J. Agric. Food Chem.* 38:92-95
- SUN, S.M. e HALL, T.C. 1975. Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 23(2):184-189
- SUN, S.M., McLEESTER, R.C., BLISS, F.A. e HALL, T.C. 1974. Reversible and irreversible dissociation of globulins from *Phaseolus vulgaris* L. seed. *J. Biol. Chem.* 249(7):2118-2121
- TAKAHASHI, N. e HIROSE, M. 1990. Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in a protein by polyacrylamide gel electrophoresis *Anal. Biochem.* 188:359-365
- THOMSON, J.A., SCHROEDER, H.E. e DUDMAN, W.F. 1978. In *Pisum sativum* L. Molecular heterogeneity. *Aust. J. Plant Physiol.* 5:263-79
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. e STAUFFER, J.F. 1972. Manometric and chemical estimation of metabolites and enzyme systems. (cap. 13). *In: Manometric and biochemical techniques*. Burgess Publishing Company Ed., Minneapolis, pp. 260-262
- VAUGHAN, J.G. 1983. The use of seed proteins in taxonomy and phylogeny. *In: Seed proteins*. J. Daussant, J. Mossé e J. Vaughan (Eds.) Academic Press, London. pp.155-191
- WRIGHT, D.J. e BOULTER, D. 1974. Purification and subunit structure of legumin of *Vicia faba* L. (Broad bean). *Biochem. J.* 141:413-418
- WU, C. e WHITAKER, J.R. 1990. Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Linden). *J. Agric. Food Chem.* 38:1523-1529