

ESTUDOS BIOQUÍMICOS SOBRE A VARIABILIDADE DA
COMPOSIÇÃO PROTÉICA EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.)

VERA LÚCIA MORETTI ROMANI

Orientadora: Dra. MARIA TERESA V. CARVALHO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: *Energia Nuclear na Agricultura.*

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1983

A minha família

Ao meu marido e filhos,

D E D I C O

-: AGRADECIMENTOS :-

- À *Dra. Maria Teresa V. Carvalho* pelo incentivo e orientação deste trabalho;
- Ao *Dr. Eric Derbyshire*, pelas discussões e sugestões valiosas no decorrer do trabalho;
- À *Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)* e a *Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal à Nível Superior (CAPES)*, pela bolsa de estudos concedida;
- Ao *Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)*, onde esse trabalho foi realizado;
- À *Srta. Clarice Matraia*, pelo auxílio técnico e a todos os *meus amigos* que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho;
- Ao *Sr. Romeu Aparecido Rocha*, pela assistência nos desenhos das figuras, e ao *Sr. Cleusval Bissi* pelos serviços de datilografia.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO.	<i>iv</i>
SUMMARY	<i>vii</i>
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades sobre a cultura do feijão.	3
2.2. Proteínas de feijão.	5
2.3. Lectinas	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais.	22
3.2. Métodos.	24
3.2.1. Preparo da farinha.	24
3.2.2. Peso seco	24
3.2.3. Extração de proteínas.	24
3.2.4. Determinação dos teores de nitrogênio total e protéico.	25
3.2.5. Análise de aminoácidos.	25
3.2.6. Preparo de suspensões eritrocitárias	27
3.2.7. Testes de aglutinação	28
3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida	30
4. RESULTADOS.	35
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES.	80
7. BIBLIOGRAFIA.	82

ESTUDOS BIOQUÍMICOS SOBRE A VARIABILIDADE DA COMPOSIÇÃO
PROTÉICA EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

VERA LÚCIA MORETTI ROMANI

ORIENTADORA: Dra. Maria Teresa V. Carvalho

RESUMO

O objetivo desse estudo foi determinar as atividades eritroaglutinantes de cultivares brasileiras de feijão e verificar se estas atividades poderiam ser relacionadas com as composições das lectinas.

A composição química das sementes foi descrita brevemente dando-se ênfase à composição protéica. Foi feita uma revisão de literatura disponível sobre histórico, propriedades e ocorrência das lectinas de sementes, especialmente aquelas de *Phaseolus vulgaris*.

Os teores de nitrogênio e a partir deles os de proteína das farinhas cotiledonares de 18 amostras de cultivares brasileiras de feijão e de duas cultivares exóticas foram determinadas pelo método de Kjeldahl. As composições em aminoácidos de doze das farinhas foram determinadas cromatografi

camente após a hidrólise ácida das farinhas. A extração de proteína da farinha foi feita com Tampão Tris-Glicina 0,005M com NaCl 2%, pH 8.3, e a concentração de proteína solúvel foi determinada por método colorimétrico. As atividades eritroaglutinantes dos extratos foram determinadas contra eritrócitos de diversas espécies animais e as composições proteica e polipeptídica da fração proteica foram examinadas por três sistemas eletroforéticos.

Os teores de nitrogênio e proteína das farinhas variaram de 2,9% a 4,1% e de 18,4 a 25,9%, respectivamente. Os hidrolizados das farinhas foram ricos em ácido aspártico e glutâmico, menos ricos em aminoácidos básicos e contiveram apenas baixos teores de metionina. Pelo menos 80% da proteína cotiledonar foi extraída pelo método empregado.

Com exceção da cv. Pinto, todos os extratos mostraram atividade eritroaglutinante contra cinco dos seis tipos de eritrócitos utilizados, entretanto suas atividades não foram iguais e variaram entre as cultivares e também com o tipo de eritrócito. O extrato da cv. Pinto não aglutinou qualquer tipo de eritrócito e nenhum dos extratos aglutinou eritrócitos de vaca não tratados. As cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce se distinguiram de todas as outras devido a suas atividades relativamente altas contra eritrócitos de vaca tratados com tripsina.

Foi também detectada variação entre as amostras quando examinadas por eletroforese sob condições não desnaturantes ácida e alcalina e por eletroforese sob condição desnaturante. Nestes três sistemas foram obtidos perfis compostos de diversas bandas e através deles a cv. Pinto e o grupo de cvs. Pintado, Jalo e Goiano precoce diferiram entre si e também dos perfis das outras amostras. Sob condição ácida foram observadas diferenças nas concentrações relativas de proteínas tipo-isolectinas, enquanto que, sob condição desnaturante foi observada variação entre as composições polipeptídicas da principal proteína, glicoproteína II.

Os dados resumidos acima foram discutidos em relação a resultados publicados por outros pesquisadores. Concluiu-se que existem diferenças entre as atividades aglutinantes de cultivares brasileiras de feijão e que estas diferenças podem ser atribuídas às variações na composição das lectinas. Também, pelo menos duas formas da principal proteína de feijão, glicoproteína II, ocorreram entre as cultivares examinadas.

BIOCHEMICAL STUDIES ON VARIABILITY IN THE PROTEIN
COMPOSITION OF BEANS (*Phaseolus vulgaris*, L.)

VERA LÚCIA MORETTI ROMANI

ADVISER: Dra. Maria Teresa V. Carvalho

SUMMARY

The objective of this study was to determine the erythroagglutinating activities of cultivars of brazilian beans and to verify if those activities could be correlated with their lectin compositions.

The chemical composition of seeds was described briefly with emphasis on protein composition, and literature available on the history, properties and occurrence of seed lectins, especially those of *Phaseolus vulgaris*, was reviewed.

The nitrogen contents, and from them the protein contents, of meals from the cotyledons of 18 samples of brazilian beans and two exotic cultivars were determined by the Kjeldahl method. The aminoacid compositions of 12 of the samples were determined chromatographically after acid hydrolysis of the meals. Protein was extracted from the meals

with 0.005 M Tris-Glicine buffer, pH 8,3 containing 2% NaCl and the concentration of the soluble protein was determined by a colorimetric method. The erythroagglutinating activities of the extracts were determined against erythrocytes of several different animal species and the protein and polypeptide compositions of the protein fractions were examined by three electrophoretic systems.

The nitrogen and protein contents of the meals varied from 2.9% to 4.1% and from 18.4% to 25.9% respectively. The hydrolysates from the meals were rich in aspartic and glutamic acids, less rich in basic aminoacids and had only low contents of methionine. At least 80% of the protein from the meals was extracted by the method employed.

With the exception of cv. Pinto, all the extracts showed erythroagglutinating activities against five of the six types of erythrocytes used, however their activities were not the same and varied among the cultivars and also in relation to the type of erythrocytes. The extract of the cv. Pinto did not agglutinate any of the types of erythrocyte and none of the extracts agglutinated untreated cow erythrocytes. The cultivars Pintado, Jalo e Goiano precoce were distinguished from all the others, because their activities were relatively high against trypsin-treated

erythrocytes from cow.

Variation was also detected among the samples when they were examined by electrophoresis under non-dissociating acidic and alkaline conditions and by electrophoresis under dissociating conditions. In these three systems profiles composed of several bands were obtained and through them the cv. Pinto and the group of cultivars Pintado, Jalo and Goiano precoce could be distinguished one from another and from the others samples. Under acidic conditions, differences were observed in the relative concentrations of isolectin-type proteins while under dissociating conditions it was observed that the polypeptide compositions of the major protein, Glycoprotein II, varied.

The data summarized above were discussed in relation to published results from other workers. It was concluded that differences among the agglutinating activities of brazilian bean cultivars exist and that these differences could be attributed to variations in lectin composition. Also, at least two forms of the major bean protein occur among the cultivars examined.

1. INTRODUÇÃO

As sementes são veículos de propagação de plantas e o homem explorou esta característica desde o período inicial do desenvolvimento da agricultura, quando ele começou a coletar e estocar sementes para plantios posteriores.

Hoje, o cultivo de plantas para obtenção de suas sementes é uma parte importante da agricultura mundial.

No Brasil, e em muitas partes do mundo o feijão (*Phaseolus vulgaris*) é um componente popular da dieta humana. Como todas as sementes, ele contém carboidratos, gorduras, proteínas, minerais, vitaminas, etc., e assim como outras leguminosas, o feijão contém teores de proteínas relativamente altos e portanto é uma importante fonte de aminoácidos da alimentação humana nacional.

A proteína do feijão não é homogênea. Diferentes proteínas possuem diferentes valores nutritivos e algu-

mas são mesmo antimetabólicas. Experimentos com ratos mostraram que o feijão cru pode ser tóxico. A toxicidade tem sido relacionada a uma fração protéica denominada lectina que tem a capacidade de aglutinar eritrócitos e estimular a divisão de linfócitos. Além dessas atividades as lectinas podem também funcionar em vários outros fenômenos biológicos como por exemplo na especificidade entre planta hospedeira e cêpas de *Rhizobium* fixadoras de nitrogênio, na proteção de plantas contra o ataque de fungos e podem aglutinar células humanas malignas.

Cultivares de feijão foram classificadas em quatro grupos de acordo com as atividades eritroaglutinantes de seus extratos de sementes. Recentemente foi mostrado também que a lectina de feijão é heterogênea.

O objetivo desse trabalho foi determinar as atividades eritroaglutinantes de cultivares brasileiras de feijão e verificar se estas atividades poderiam ser relacionadas com as composições das lectinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Generalidades sobre a cultura do feijão

O gênero *Phaseolus* teve dois centros primários de origem (KAPLAN, 1956). O mais importante está localizado na América Central, nos altiplanos do México e Guatemala, com altitudes variáveis de 500 - 1500 metros, e o outro localiza-se na Ásia Tropical, conhecido há longo tempo. Espécies de importância econômica se desenvolveram de cada um desses centros, e em particular o feijão (*Phaseolus vulgaris*) originário da América Central. Os centros de origem são totalmente independentes, com as espécies de cada um deles tendo evolução e domesticação diferentes (KAPLAN, 1956; TAYLOR, 1966; MIRANDA, 1968). Esse fato é de máxima importância no melhoramento genético da cultura, pois estabelece duas fontes distintas de obtenção de resistência a organismos patogênicos e a fatores ambientais adversos (VIEIRA, 1978).

Uma área superior a cinco milhões de hectares

é ocupada pelo feijão no país, com uma produção aproximada de dois e meio milhões de toneladas e um rendimento médio de 500 kg/ha (CNPAF, 1980). O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de feijão e sua produção é quase totalmente destinada ao consumo interno.

MEDINA (1972) afirma que com o empobrecimento gradual de nossas terras, com a continuidade de métodos ineficientes de produção e com o crescente aumento populacional, as colheitas brasileiras de feijão mal têm dado para atender as necessidades populares. Basta qualquer contrariedade climática para que falte o feijão cotidiano, obrigando-nos a apelar para importações, no entanto, bastaria que os agricultores usassem as práticas culturais e as novas variedades que as pesquisas e experimentações agrônômicas desenvolveram, para que tivéssemos, a menor preço, produção abundante de feijão, cujo excesso poderia ser exportado, e tudo isso sem aumento da área de plantio.

O feijão está sempre presente na dieta da população brasileira devido as suas propriedades organolépticas e o Brasil apresenta o índice de consumo "per capita" mais alto do mundo (JUNQUEIRA, 1972). Devido a isso e ao fato do feijão ser uma rica fonte de aminoácidos e de calorias, a cultura tem um grande valor nutricional para o povo (FIBGE, 1979).

Os aminoácidos do feijão estão contidos quase

que totalmente na proteína. A eficiência de uma proteína como uma fonte de aminoácidos na dieta é dependente de seu teor e da proporção dos aminoácidos essenciais: metionina, lisina, triptofano, fenilalanina, treonina, valina, leucina, isoleucina (FAO/WHO, 1970). O valor nutricional em potencial da proteína de feijão está limitado pelo seu teor de aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína e esta limitação é grandemente responsável pelo valor biológico relativamente baixo da proteína do feijão (64%), quando comparada com aqueles de outras proteínas mais ideais tal como é a proteína do ovo (100%). Nesse sentido, no Brasil destacam-se os trabalhos efetuados por CHAVES *et alii* (1952), SOUZA e DUTRA DE OLIVEIRA (1969); LIMA (1970) e ZUCOLOTO e CORDEIRO (1971). Outros fatores também podem contribuir para a incompleta utilização da proteína e estes incluem os inibidores protéicos da enzima proteolítica tripsina e a proteína lectina (KAKADE e EVANS, 1966; JAFFÉ e LETTE, 1968). Esta última proteína pode mesmo ser tóxica quando incluída em dietas animais (JAFFÉ e GAEDE, 1959; HONOVAR, 1962). Então a fração protéica do feijão contém ambos componentes, nutricionais e anti-nutricionais.

2.2. Proteínas de feijão

O teor protéico de sementes varia entre cultu

ras. As leguminosas geralmente contêm entre 15% a 50% do peso de suas sementes como proteína e os cereais entre 6% e 16%. Análises do feijão (*Phaseolus vulgaris*) têm dado teores ao redor de 17% a 32% e a maior parte desta variação é intercultivares (ver por exemplo TULMANN NETO, 1975; SGARBIERI, 1979; CURY, 1980; CARVALHO, 1981). Esta proteína é heterogênea e as diferentes proteínas não possuem as mesmas funções. Então, algumas são metabólicas, algumas são estruturais e outras são proteínas de reserva. As proteínas metabólicas incluem as enzimas e estão envolvidas na síntese dos outros tipos de proteínas, as estruturais são encontradas em membranas e as proteínas de reserva funcionam como fontes de nitrogênio e carbono durante a germinação da semente.

As proteínas de sementes podem ser classificadas não somente pelas suas funções, mas também pelas suas composições químicas ou por suas propriedades físicas. Muitos dos métodos de laboratório para a separação de proteínas são baseados em suas propriedades físicas, e em seu trabalho pioneiro sobre proteínas de sementes, OSBORNE (1924), classificou proteínas por suas solubilidades em vários solventes. Essa classificação permitiu a separação de proteínas em quatro categorias:

- 1) ALBUMINAS - Solúveis em água;
- 2) GLOBULINAS - Solúveis em soluções salinas e insolúveis em água.

3) PROLAMINAS - Solúveis em álcool.

4) GLUTELINAS - Solúveis em alcalis diluídos.

Subsequentemente, esta classificação foi complementada por YEMM (1958):

1) ALBUMINAS - Solúveis em água e em soluções salinas diluídas.

2) GLOBULINAS - Solúveis em soluções salinas neutras e fracamente solúveis em água.

3) PROLAMINAS - Solúveis em 70 - 80% de etanol, mas insolúveis em água ou etanol puro.

4) GLUTELINAS - Insolúveis nos solventes acima, mas solúveis em ácidos ou álcalis diluídos.

As proteínas de sementes de leguminosas são constituídas principalmente por albuminas e globulinas. Infelizmente a distinção entre estes dois grupos não é bem definida, uma vez que certas globulinas são solúveis, em muito baixas concentrações, na água. O termo euglobulina tem sido usado para este tipo de proteína (HILL e BREIDENBACH, 1974a; 1974b), não obstante esta ressalva, a classificação de OSBORNE tem sido muito útil e bastante empregada em estudos comparativos.

Geralmente, as albuminas correspondem às proteínas metabólicas enquanto que as globulinas de sementes são representadas principalmente pelas proteínas de reserva.

As proteínas do feijão foram uma das primeiras a serem estudadas por OSBORNE (1894a e b). Duas frações protéicas solúveis em solução salina foram separadas, e a principal fração, que representou 85% da proteína extraída foi denominada phaseolina e a fração secundária (12%) phaselina. Subsequentemente, WATERMAN *et alii* (1923) e JONES *et alii* (1937-1938) demonstraram a ocorrência de uma terceira fração solúvel em solução salina que eles designaram conphaseolina.

Usando-se procedimentos bioquímicos mais refinados, PUSZTAI (1966; 1970) isolou e purificou uma glicoproteína de feijão com propriedades globulínicas e a designou de glicoproteína II. Esta proteína foi mostrada eventualmente (RACUSEN e FOOTE, 1971) representar pelo menos 46% da proteína extraída e portanto ela provavelmente correspondia à principal fração protéica de OSBORNE. Nos Estados Unidos, McLEESTER *et alii* (1973) relataram o isolamento de duas frações de globulina de feijão, denominando a principal fração de legumina e a outra de vicilina, termos usados por OSBORNE e CAMPBELL (1896) para as principais proteínas de *Pisum sativum* e subsequentemente aplicados de maneira generalizada por DANIELSON (1949) para as principais globulinas de diversas espé

cies de leguminosas. Em contraposição ao trabalho de Mc LEESTER *et alii* (1973) a principal proteína do feijão tem sido confirmada como sendo a glicoproteína II purificada por PUSZTAI e que é uma vicilina tipo globulina (BARKER *et alii*, 1976), enquanto que uma proteína tipo legumina representou somente 15% da fração globulínica (DERBYSHIRE e BOULTER, 1976).

Análises de aminoácidos da principal proteína globulínica mostram que ela possui somente baixos teores de aminoácidos sulfurados e portanto ela é a principal responsável pelos teores relativamente baixos de aminoácidos sulfurados do feijão (PUSZTAI e WATT, 1970; RACUSEN e FOOTE, 1971; SUN *et alii*, 1974 e BARKER *et alii*, 1976).

Estas duas principais proteínas globulínicas estão localizadas em partículas membranosas chamadas corpos protéicos, também conhecidos como grãos de aleurona. Diversos pesquisadores têm usado esta localização como base para a definição de proteínas de reserva (ALTSCHUL *et alii*, 1961; TOMBS, 1967; ERICSON e CHRISPEELS, 1973). Estas proteínas são sintetizadas nas membranas dos polissomas e então canalizadas através do retículo endoplasmático para os corpos protéicos (BAILEY e BOULTER, 1970; DIECKERT e DIECKERT, 1976).

Ao contrário dessas duas principais proteínas globulínicas, uma outra que se apresenta em concentração relativamente alta em extratos salinos é encontrada depois do fra

cionamento desses extratos, em ambas frações albumínica e globulínica (MANEN, 1978; CARVALHO, 1981). Esta proteína é a lectina do feijão que será considerada nos tópicos seguintes.

2.3. Lectinas

A primeira descrição do que hoje nós conhecemos por lectina, foi dada por STILLMARK (1888), quando investigava o efeito tóxico de "castor bean" (*Ricinus communis*), e verificou que as células vermelhas do sangue eram aglutinadas.

LANDSTEINER e RAUBTSHECK (1908) mostraram que as sementes de espécies comestíveis de algumas leguminosas comuns como feijão, lentilha e ervilha também contêm hemaglutininas. Eles mostraram atividade hemaglutinante, de vários extratos de sementes totalmente diferentes quando testados com eritrócitos de diferentes animais e compararam esta especificidade com anticorpos do soro do sangue dos animais:

Em 1936, SUMNER e HOWELL identificaram que a concanavalina A (con A), uma proteína isolada por eles em 1919 de *Canavalia ensiformis* era uma fitohemaglutinina, que aglutinava eritrócitos de cavalos, numa concentração tão baixa como 0,1 µg/ml.

RENKONEN em 1948 e BOYD e REGUERA em 1949 rela

taram que lectinas de várias sementes mostraram um alto grau de especificidade contra antígenos humanos de vários grupos sanguíneos, o que foi demonstrado pelo extrato de "lima bean" (*Phaseolus limensis*) que é virtualmente específico para o antígeno do grupo A, ainda que quando concentrado reaja fracamente com células do tipo B. Semelhantemente, sementes de *Vicia cracca* contêm lectinas poderosas que atacam mais fortemente células do grupo A do que B ou O. De fato, esta especificidade de aglutinar células de tipos específicos de sangue, levou BOYD e SHAPLEIGH (1954) a criar a palavra lectina (legere em latim significa escolher), um termo que é hoje usado como sinônimo de fitohemaglutininas (entretanto ver CARVALHO, 1981).

Vários grupos de pesquisadores, têm trabalhado com um grande número de espécies procurando encontrar especificidade. Hoje já são conhecidas lectinas específicas para os grupos sanguíneos humanos A, O, M e N e o sub-grupo A₁, por isso têm sido usadas para tipagem sanguínea e em investigações de base química da especificidade de grupos sanguíneos (KRUPPE, 1956; TIGGELMAN - VAN KRUGTEN *et alii*, 1956; BIRD, 1959; ALLEN e BRILLIANTINE, 1969; TOMS e WESTERM, 1971; SHARON e LIS, 1972). Uma das maiores investigações sobre aglutininas de sementes foi feita por ALLEN e BRILLIANTINE (1969). Esses autores investigaram 2.663 amostras de sementes, destas

711 foram não específicas e 90 foram específicas para um ou outro grupo sanguíneo

Durante este período também GOLDSTEIN (1967) mostrou que a interação de lectinas com células, pode, em muitos casos ser inibida especificamente por açúcares simples. Os resultados desses estudos levaram a conclusão de que as lectinas se unem especificamente a sacarídeos, na superfície das células. Essa propriedade tem sido usada para isolar e purificar polímeros de carboidratos, e para o estudo de sua estrutura química, e também, ajudou o desenvolvimento de uma nova técnica de purificação das próprias lectinas, a cromatografia de afinidade.

Muitos dos resultados entre espécies sobre a ocorrência de lectinas específicas foram sumarizados por TOBISKA (1964) em sua revisão do período de 1885-1960. No gênero *Phaseolus*, dois principais grupos podem ser distinguidos, de acordo com a especificidade de eritroaglutinação. O primeiro grupo, representado pelo *Phaseolus limensis*, contém atividade eritroaglutinante específica, o outro grupo contém lectinas não específicas e é representado pelo *Phaseolus vulgaris* e suas numerosas variedades. As lectinas do primeiro grupo são inibidas por N-acetil-D-galactosamina, as do segundo grupo não são inibidas por açúcares simples. TOMS e WESTERM (1971) enfatizaram que também já são conhecidas lectinas espe

cíficas para eritrócitos de diferentes animais, como por exemplo, algumas lectinas de *Phaseolus vulgaris* específicas para eritrócitos de frango, cobaia, coelho e carneiro. JAFFÉ *et alii* (1972) fizeram um estudo sistemático da atividade eritroaglutinante de um grande número de cultivares e variedades de *Phaseolus vulgaris* em relação à ação sobre eritrócitos humanos e de diferentes animais. Eles utilizaram eritrócitos de nove animais diferentes e eritrócitos humanos do grupo A, B e O. Alguns eritrócitos foram tratados com tripsina ou pronase e agruparam as variedades e cultivares em quatro grupos:

Grupo A - Aglutinou todos os eritrócitos com exceção aos de vaca não tratados com tripsina.

Grupo B - Aglutinou todos os eritrócitos, com exceção aos de vaca, tratados ou não com tripsina.

Grupo C - Aglutinou unicamente eritrócitos de vaca tratados com tripsina.

Grupo D - Aglutinou unicamente os eritrócitos de hamster tratados com pronase.

Enquanto o trabalho experimental descrito nas sessões seguintes estava em andamento, outros estudos sobre variações nas capacidades aglutinantes de extratos de feijão

foram relatados (FELSTED *et alii*, 1981; BROWN *et alii*, 1982). Por testes de aglutinação usando eritrócitos humano e de coelho, FELSTED e colaboradores separaram três grupos de cultivares entre as 62 examinadas. Em contraposição, BROWN *et alii* relataram que oito grupos de cultivares puderam ser detectados entre as 100 cultivares que eles examinaram através de eletroforese bi-dimensional e aglutinação contra eritrócitos de coelho e vaca.

Em estudos de localização celular, as lectinas foram encontradas essencialmente no citoplasma de células de cotilédones e do embrião de *Phaseolus vulgaris*, através da técnica de imunodifusão, imunoeletroforese e imunoperoxidase por MIALONIER *et alii* (1973). CLARKE *et alii* (1975) usando imunoglobulina fluorescente confirmaram a localização predominantemente citoplasmática de Con A de *Canavalia ensiformes* e de lectinas de *Phaseolus vulgaris* que foram detectadas ao redor de grãos de amido e dos corpos protéicos. PUSZTAI *et alii* (1977) usando sedimentação diferencial localizaram a lectina de *Phaseolus vulgaris* na fração cotiledonar que era composta de corpos protéicos. HAMBLIN e KENT (1973) mostraram aglutinação nos pelos absorventes e primórdios de raízes de *Phaseolus vulgaris*. CLARKE *et alii* (1975) localizaram uma lectina nos espaços intercelulares, bem como nas paredes celulares e no citoplasma periférico das células do parênquima cotiledonar de *Phaseolus vulgaris* e *Canavalia ensiformis*.

Para purificar lectinas de *Phaseolus vulgaris* RIGAS e OSGOOD (1955); JAFFÉ e GAEDE (1959) usaram a precipitação com sulfato de amônio. Subsequentemente, técnicas bioquímicas mais refinadas foram empregadas no isolamento de aglutininas, como por exemplo cromatografia de troca iônica em DEAE e CM-Celulose, como o fizeram para purificar lectinas de *Phaseolus vulgaris*, TAKAHASHI *et alii* (1967), DAHLGREN *et alii* (1970), MONSIGNY *et alii* (1972), SELA *et alii* (1973); ROSANEN *et alii* (1973); ANDREWS (1974); MOREIRA e PERRONE (1977); eletroforese de fluxo livre como o fizeram JAFFÉ e HANNIGS (1965), PUSZTAI e WATT (1973), GALBRAITH e GOLDSTEIN (1972) purificaram lectinas de *Phaseolus limensis* ("lima bean") por adsorção específica a uma coluna de polileucil, uma substância insolúvel do sangue humano tipo A. Como um resultado do melhoramento nas técnicas empregadas na purificação de lectinas, tornou-se possível determinar mais precisamente as configurações químicas específicas com as quais as aglutininas se combinam. Esse conhecimento e o desenvolvimento de procedimentos relativamente simples para a ativação de suportes insolúveis comercialmente disponíveis (como Sepharose) e para o acoplamento de ligantes apropriados a estes suportes, levaram ao emprego muito mais variado das colunas de afinidade. Uma glicoproteína que vem sendo empregada com sucesso como ligante para a lectina de *Phaseolus vulgaris* é a tiroglobulina de porco (MATSUMOTO e OSAWA, 1972; FELSTED *et alii*, 1975); Tiro-

globulina é precipitada pelas lectinas de *Phaseolus vulgaris* e é um forte inibidor de suas atividades aglutinantes (MATSUMOTO e OSAWA, 1972). Ela possui um glicopeptídeo com estrutura e propriedades semelhantes àsquelas do receptor eritrocitário de lectinas de *Phaseolus vulgaris* (KORNFELD e KORNFELD, 1970; TOYOSHIMA *et alii*, 1972). Esses glicopeptídios foram, em bases moleculares, inibidores mais potentes para as lectinas do feijão do que os açúcares simples (LESENEY *et alii*, 1972; PUSZTAI e WATT, 1974) por isso tem sido sugerido que as lectinas de *Phaseolus vulgaris* possuem um sítio de ligação que "reconhece" não um monossacarídeo, mas um oligossacarídeo numa conformação bastante precisa, (KAUSS, 1976). Portanto, as lectinas são eficientemente purificáveis por cromatografia de afinidade e podem ser estudadas em detalhes (MANEN e MIÉGE, 1977; MANEN, 1978).

O trabalho de alguns grupos de pesquisadores (WEBER *et alii*; 1972; YACHNIN e SVENSON, 1972; ALLEN *et alii*, 1973; LEAVITT *et alii*, 1975) demonstrou que o PM das lectinas de feijão é 120.000 e elas são compostas de dois tipos de subunidades com PM próximo de 29.000 e 32.000. Todavia a fração lectínica é heterogênea e dois tipos de moléculas que diferem em suas atividades fisiológicas tem sido separadas. Um tipo com atividade aglutinante (tipo A) e o outro sem atividade aglutinante mas com atividade mitogênica (tipo B). Pelo uso de eletroforese, YACHNIN e SVENSON (1972) e MILLER *et alii* (1973);

demonstraram cinco tipos de moléculas designadas "isoelectinas" em suas preparações lectínicas. MILLER *et alii* (1973) propuzeram que as cinco isoelectinas são moléculas tetraméricas compostas de diferentes combinações dos dois tipos de subunidades: AAAA; AAAB; AABB; ABBB; BBBB. A existência de uma situação mais complexa foi sugerida por PUSZTAI e WATT (1974), que separaram uma preparação lectínica por focalização isoelétrica em no mínimo doze frações albumínicas com diferentes pontos isoelétricos e uma globulínica. Com respeito a composição química, MILLER *et alii* (1973) mostraram que os dois tipos de subunidades lectínicas tem o mesmo amino ácido N-terminal, serina, e o mesmo amino-ácido C-terminal, leucina, e suas composições em carboidratos são semelhantes. MILLER *et alii* (1975) mostraram também que as duas subunidades diferem em suas sequências de aminoácidos até o resíduo número sete, as sequências dos resíduos número oito até o número vinte e quatro foram as mesmas para ambos os tipos de subunidades como também foram os três últimos resíduos. Cada subunidade conteve dois resíduos de glicosamina e seis ou sete resíduos de manose ligados a cadeia polipeptídica através de asparagina na posição doze.

Recentemente FORIERS *et alii* (1977) confirmaram os resultados de sequência de aminoácidos relatados por MILLER *et alii* (1975) e foram ainda mais além, mostrando as semelhanças entre as sequências das lectinas de feijão com lectinas de outros gêneros de leguminosas.

Com a disponibilidade de métodos para isolar lectinas foi possível investigar suas atividades, inicialmente para explicar observações feitas usando-se extrato bruto como por exemplo a toxicidade e, subsequentemente em situações novas na agricultura e na medicina.

Quando lectinas de feijões com alta atividade eritroaglutinante são purificadas, a atividade do inibidor de tripsina é eliminada, se são administradas na dieta, causam inibição definitiva de crescimento, e em níveis altos apressam a morte de ratos, galinhas e outros animais experimentais. (JAFFÉ, 1960; LIENER, 1974). JAFFÉ demonstrou que o modo de ação das lectinas é resultante de uma combinação com as células do epitélio intestinal e sugeriu que isso pode interferir na absorção dos nutrientes.

JAFFÉ *et alii* (1972) observaram que apenas os extratos que aglutinaram eritrócitos de vaca tratados com tripsina foram tóxicos, e os testes alimentares confirmaram o fato de que feijões de variedades cujos extratos apresentaram atividade aglutinante contra eritrócitos de vaca tratados com tripsina foram tóxicos e proporcionaram muito pouco crescimento quando administrados a ratos. As variedades que não aglutinaram eritrócitos de vaca, ou aglutinaram apenas eritrócitos de coelhos não foram tóxicas quando testadas como ali-

mento, por isso, o uso de eritrócitos de vaca tratados com tripsina é muito útil para detectar a potencialidade tóxica de feijões.

Como já foi dito anteriormente algumas lectinas purificadas de feijão possuem tanto atividade eritroaglutinante quanto mitogênica. (JAFFÉ *et alii*, 1965; TAKAHASHI *et alii*, 1967; DAHLGREEN *et alii*, 1970; WEBER *et alii*, 1972; YACHNIN e SVENSON, 1972; ALLEN *et alii*, 1973; LEAVITT *et alii*, 1975). Não só as lectinas eritroaglutinantes são importantes como também as mitogênicas, uma vez que podem estimular linfócitos a crescer e se dividir, desprezando a especificidade antigênica dos receptores dos linfócitos, então, uma grande proporção de linfócitos numa preparação pode ser estimulada e analisada (NOWELL, 1960), e as grandes mudanças no tamanho, forma e eventos bioquímicos observados nos linfócitos estimulados por lectina em laboratório parecem se assemelhar muito às induções pelo antígeno nas reações imunológicas da vida dos animais.

Tem sido feito extensivos estudos sobre a atividade de lectinas em sistemas animais. Uma recente observação sobre a especificidade de lectinas sobre células de tumores (o que interessou especialmente a cientistas ligados a pesquisa do câncer) foi que algumas lectinas aglutinaram preferencialmente células de cultura de tecido mamário, que foram

transformados por viroses oncogênicas, por carcinogênicos químicos ou mesmo por transformações espontâneas. Alguns resultados indicaram que existe diferença nas superfícies de células normais e células transformadas. Então, estão sendo feitas investigações para o uso de lectinas como inibidoras de crescimento de células malignas "in vitro" e "in vivo", além da ligação da lectina com polímeros sintéticos para imunizar ratos contra tumores (BOURRILLON, 1973).

Os estudos sobre o papel das lectinas nas plantas são mais escassos, KRUIPE (1956), ENSGRABER (1958) e LIENER (1964), demonstraram que as lectinas servem como apreensoras de carboidratos e possivelmente elas poderiam funcionar no transporte dos carboidratos, ou na sua deposição nas sementes. As lectinas representam uma forte porcentagem das proteínas totais das sementes de leguminosas: em *Phaseolus vulgaris* cerca de 12% das proteínas é lectina (MANEN, 1978), enquanto que HAGUE (1975) calculou para três variedades de *Canavalia ensiformis* porcentagens de Con A entre 23 e 28%. Por causa disso, tem sido sugerido que as lectinas possam ter uma função de proteína de reserva (LIENER, 1964; MANEN, 1978; HAGUE, 1975). Concanavalina A, lectina de soja, de "castor bean" e de amendoim são capazes de aglutinar protoplastos preparados de várias espécies de plantas, embora outras lectinas não tenham essa capacidade (LARKIN, 1978). Também existe uma hipótese de que as lectinas determinam a especificidade no pro-

cesso simbiótico entre leguminosa e *Rhizobium* havendo uma possibilidade de que as lectinas presentes nas raízes de leguminosas não sejam as mesmas acumuladas em sementes (GATEHOUSE e BOULTER, 1980). Ainda que, algumas lectinas tenham sido encontradas se ligando a fungos, inibindo seu crescimento e retardando a germinação de esporos, ainda não está estabelecido se as lectinas têm papel fisiológico na proteção de plantas contra fungos patogênicos (ETZLER, 1981). O isolamento de lectinas de paredes celulares vegetais levou a proposição de que elas participam como "proteínas de reconhecimento" no posicionamento de carboidratos na parede celular e/ou na regulação do crescimento da parede celular (KAUSS e GLASER, 1974).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Neste trabalho foram usadas sementes maduras de *Phaseolus vulgaris* obtidas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) através do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), com data de colheita de 1981 (*Tabela 1*). Foram descartadas as sementes danificadas, e as boas estocadas à 4°C.

O sangue humano, do grupo A, Rh positivo, de doador sadio, foi recebido em citrato de sódio 4%.

O sangue de um único indivíduo sadio, de cada tipo: vaca, carneiro e coelho, criados no CENA, também foram recebidos em citrato de sódio 4%.

As substâncias químicas foram de grau analítico ou eletroforéticos.

Tabela 1 - Cultivares utilizadas, com suas respectivas origem, cor, comprimento e peso das sementes.

C U L T I V A R E S	ORIGEM	COR TEGUMENTO	COMP. MÉDIO (mm)	PESO MÉDIO (mg)
Bico de Ouro	IAC	marrom médio	9,4	246,0
Roxão	CENA	roxo escuro	8,3	177,4
Aete-3	IAC	bege médio	7,1	215,2
Carioca (1)	IAC	marrom rajado	11,6	309,5
Carioca (2)	CENA	marrom rajado	9,0	308,2
Carioca precoce	CENA	marrom rajado	8,1	204,4
Rico-23	IAC	preto	7,2	148,5
Rosinha G ₂	IAC	marrom médio	8,3	260,3
Venezuela-350	CENA	preto	9,4	220,4
Rosinha F79:1-6	CENA	marrom médio	8,3	260,3
Chumbinho opaco	IAC	marrom escuro	8,3	206,0
Catu	IAC	bege	8,7	183,2
Iguaçu	CENA	preto	7,2	170,9
Piratã	CENA	marrom escuro	9,2	244,8
Rosinha F79:109-114	CENA	marrom médio	8,5	262,0
Jalo	IAC	bege amarelado	15,0	468,0
Goiano precoce	IAC	bege amarelado	11,5	343,3
Pintado	IAC	marrom pintado	12,6	520,6
Porriño	EMBRAPA/CIAT	preto	9,0	207,3
Pinto	EMBRAPA/CIAT	marrom pintado	11,1	273,9

OBS.: Os valores do comprimento e do peso foram adquiridos com base na observação de trinta sementes e determinada a média aritmética para cada dado.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo da farinha

As sementes foram descascadas manualmente, descartando-se o tegumento e o eixo embrionário. Os cotilédones foram transformados em farinhas, também manualmente, com auxílio de almofariz com pistilo até pó bem fino, e depois passadas em peneira de 0,250 mm e estocadas à 4°C em dessecador.

3.2.2. Peso seco

Amostras individuais de aproximadamente 1 g, em duplicata foram colocadas em estufa a 60°C até peso constante.

3.2.3. Extração de proteínas

Cem mg do pó da farinha foram transferidas para 1 becker, adicionando-se 4 ml de Tampão Tris Glicina 0,005 M com NaCl 2%, pH 8,3 (DAHLGREN *et alii*, 1970; FELSTED *et alii*, 1981), agitado por 30 minutos à 4°C e, em seguida centrifugado à 15.000 rpm por 20 minutos também à 4°C.

O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi considerado o extrato.

3.2.4. Determinação dos teores de nitrogênio total e protéico

O nitrogênio total nas farinhas cotiledonares foi determinado, empregando-se o método de Kjeldahl, com digestão sulfúrica das amostras e como padrão foi usado uma solução de sulfato de amônio 2.359 g/100 ml de H₂O. (KEIL e SORMOVA, 1965).

Os teores de proteína total foram calculados multiplicando-se os valores de nitrogênio pelo fator 6,25 (BEEVERS, 1976; KEIL e SORMOVA, 1965).

A proteína solúvel foi determinada pelo método de LOWRY *et alii* (1951), usando soro albumina bovina (BSA) como padrão. Uma curva típica de calibração é representada na *Figura 1*.

3.2.5. Análise de aminoácidos

Amostras em duplicata foram hidrolizadas em

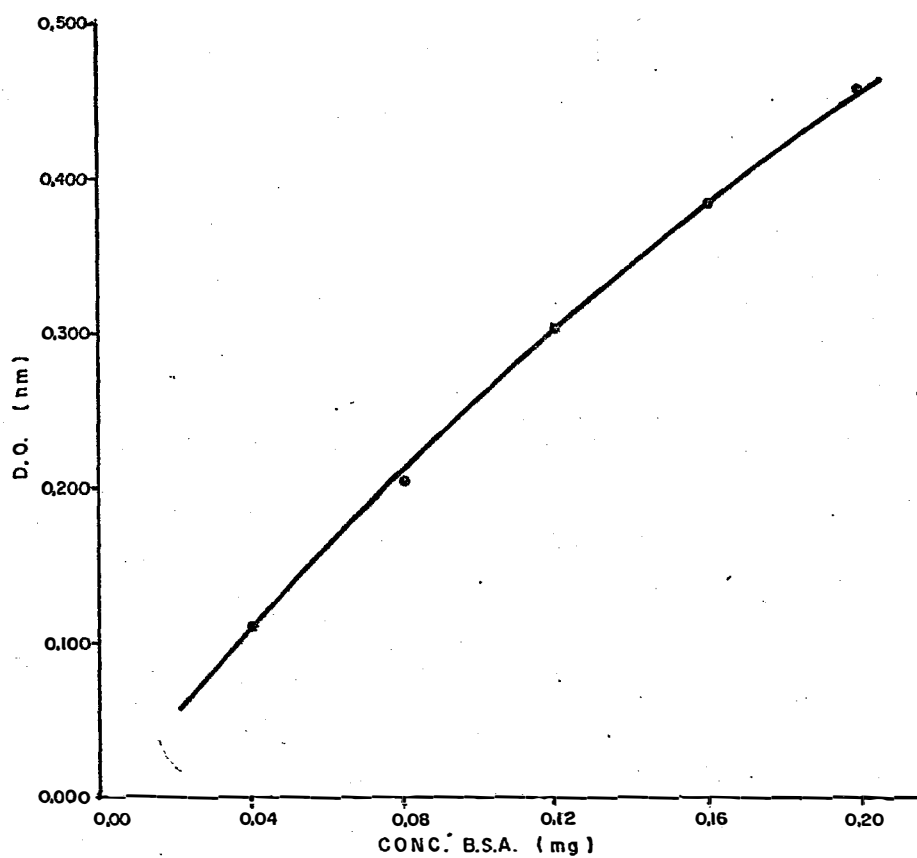


Figura 1 - Curva padrão para determinação da proteína solúvel pelo método de LOWRY *et alii* (1951).

HCl 6 N durante 22 horas a 110°C em presença de 2-Mercaptoetanol 10% num volume final de 10 ml. As quantidades das amostras corresponderam a uma concentração de proteínas totais equivalentes a 0,3 mg por ml de ácido. A composição em aminoácidos foi determinada num Analizador Automático Modelo 120C da Beckman, segundo instruções do fabricante.

3.2.6. Preparo de suspensões eritrocitárias

A suspensão eritrocitária foi obtida com três lavagens sucessivas do sangue, com solução salina 0,15M e centrifugando-se a 2.000 rpm por 10 minutos após cada lavagem. O volume de glóbulos vermelhos obtido após centrifugação foi medido e um volume proporcional de tampão fosfato 0,01 M com NaCl 0,15 M, pH 7.0 foi adicionado para obtenção da suspensão eritrocitária a 4%.

Suspensões de eritrócitos de vaca e de carneiro foram também obtidas após o tratamento com proteases (JAFÉ *et alii*, 1972). Eritrócitos obtidos de 5 ml de sangue de vaca foram lavados 3 vezes como descrito acima e após a última lavagem foram incubados com 5 ml de solução de tripsina em salina fisiológica (1 mg/100 ml) por 1 hora a 25°C. Após in-

cubação os eritrócitos foram lavados mais 3 vezes com salina fisiológica e preparada a suspensão eritrocitária a 4% com tampão fosfato 0,01 M com NaCl 0,15 M.

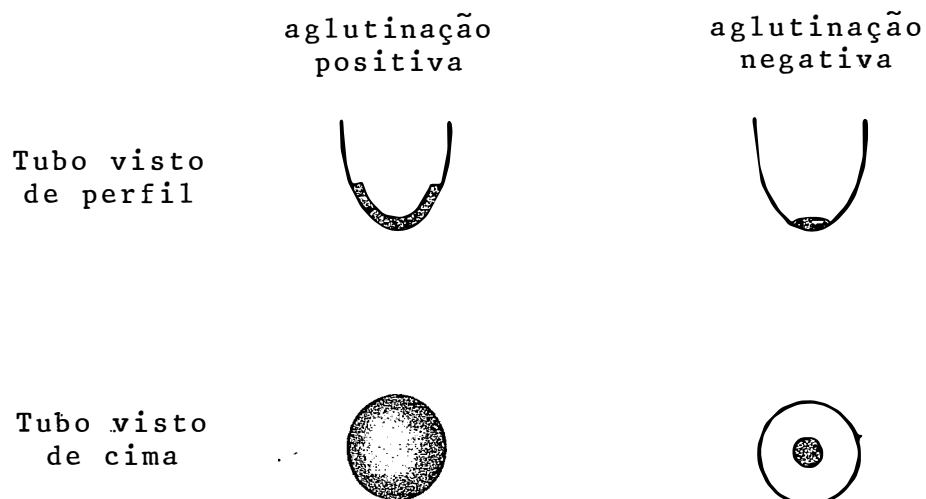
Os eritrócitos do sangue de carneiro, equivalentes a 5 ml de sangue, após a terceira lavagem foram incubados por 1 h a 25°C com 3 ml de pronase em salina fisiológica (1 mg/10 ml). Após a incubação foram lavados mais três vezes com a salina fisiológica e preparada uma suspensão eritrocitária a 4% com tampão fosfato 0,01 M com NaCl 0,15 M.

3.2.7. Testes de aglutinação

A atividade aglutinante foi medida segundo o método semi-quantitativo de SALK (1944), com eritrócitos humanos de sangue tipo A Rh⁺, de vaca, carneiro e coelho.

Para a análise, os extratos foram diluídos em progressão geométrica (1/2, 1/4, 1/8...) com tampão fosfato e um mesmo volume de suspensão eritrocitária foi adicionado. Salina fisiológica e duas preparações de títulos conhecidos foram usadas como controle em todas as placas de aglutinação.

A aglutinação é macroscopicamente visível porque os aglutinados aderem às paredes dos tubos e os eritrócitos não aglutinados vão para o fundo do tubo.



O título de aglutinação de um extrato corresponde ao inverso da maior diluição que produz uma aglutinação. A atividade aglutinante específica é definida pelo título de aglutinação do extrato em relação ao seu teor protéico (LOWRY).

A atividade eritroaglutinante, foi também estimada pelo cálculo da concentração mínima de proteína (em 25 μ l) que dá aglutinação detectável de 25 μ l de suspensão eritrocitária a 4%.

Todos os testes foram feitos utilizando-se material de micropipetagem e microdiluição da "Cooke Engineering

Company", Alexandria, Wisconsin.

3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações protéicas das cultivares de feijão estudadas, foram submetidas à eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida. Três sistemas foram empregados:

a) Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condição alcalina, não desnaturante (DAVIS, 1964).

Foram utilizados géis com 2 tipos de porosidade, sendo colocados em tubos ou em placas verticais, com o gel de grandes poros (3% em acrilamida) polimerizado no topo do gel de pequenos poros (7,5% em acrilamida). Em 1 ml dos extratos brutos das amostras foi colocado 0,25 ml de glicerol. O tampão de migração foi Tris-glicina 0,005 M, pH 8.3 e azul de bromofenol 0,1% foi incorporado como corante indicador.

As corridas foram feitas com uma corrente de 2 - 4 mA por tubo durante aproximadamente 2 horas, e em placa com 10 - 30 mA durante três horas e meia, do cátodo para o ânodo. O corante utilizado foi "Amido black" 1% em ácido acético 7%. O excesso de corante foi removido por difusão em ácido acético 7%, com sucessivas trocas da solução.

b) Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição ácida, não desnaturante (REISFELD *et alii*, 1962). O gel de pequenos poros (separador) foi 7,5% em acrilamida e o gel de grandes poros (espaçador) foi de 3%. O tampão de migração foi β -alanina-ácido acético, 0,35 M, pH 4.5. A corrente aplicada foi de 3 mA por tubo durante quatro horas e meia e em placa foi de 10-30mA por placa, durante aproximadamente seis horas e meia, sempre do ânodo para o cátodo.

Os géis foram corados em "*Amido black*" 1% em ácido acético 7% e descorados por difusão em ácido acético 7%, ou corados em "*Comassie Brilliant Blue*", na forma R 0,05% dissolvido em metanol: ácido acético: água (25:7:68 ml) e descorado por difusão no próprio solvente.

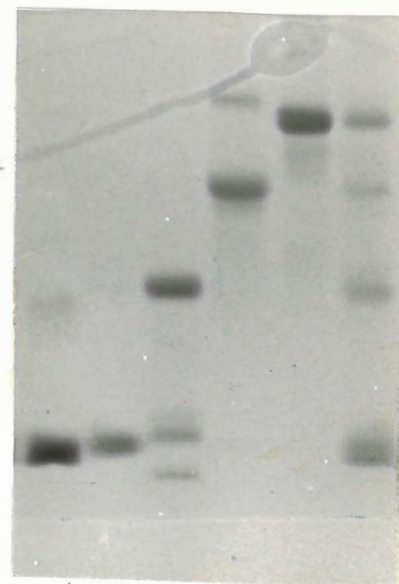
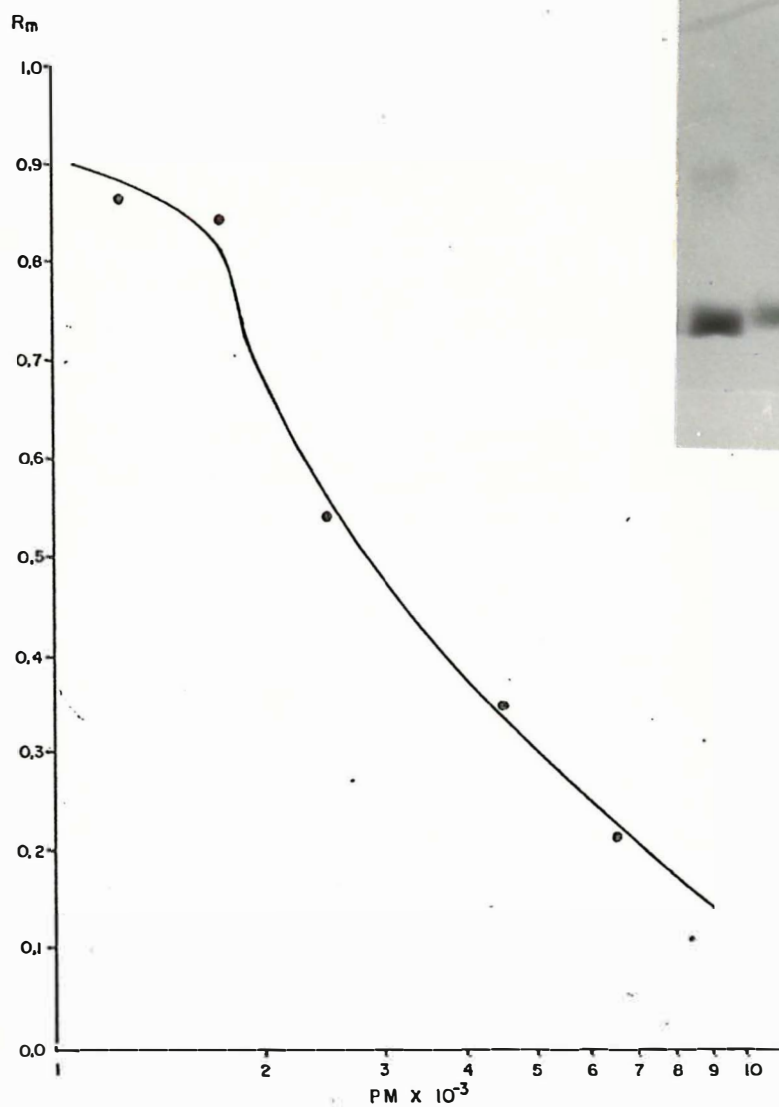
c) Eletroforese desnaturante foi efetuada segundo o método de LAEMMLI (1970) modificado. As concentrações finais no gel de separação (pequenos poros) foram as seguintes: gel a 10% de acrilamida, 0,05% de N,N'-bis-metileno acrilamidamida, em presença de Tris-HCl 0,375 M e dodecyl-sulfato de sódio (SDS) 0,1%. A concentração de acrilamida no gel espaçador foi de 3%.

As amostras foram dissociadas em solução contendo SDS 8%, Tris-glicina 0,25M pH 8.3, adicionando-se 2-mercaptoetanol para 0,15 M e glicerol para 15% e 0,1% de azul

de bromofenol. As proteínas foram completamente dissociadas pela imersão das amostras em banho de água fervente por 10 minutos. O tampão de migração continha SDS 0,1% e Tris-glicina 0,005 M, pH 8.3. A corrente aplicada foi de 2 mA por tubo, do cátodo para o ânodo, até que o corante indicador (azul de bromofenol 0,1% em água) atingisse a parte inferior dos tubos (cerca de 3 h), ou das placas (cerca de 5,30 h). As proteínas foram coradas com "*Comassie Brilliant Blue*" na forma R 0,05% na mistura metanol:ácido acético:água (25:7:68 ml) e descoradas por difusão no mesmo solvente. Os pesos moleculares dos polipeptídios dissociados foram estimados posteriormente à eletroforese, com referência a uma curva de calibração obtida usando-se proteínas de pesos moleculares conhecidos, submetidas ao mesmo desenvolvimento eletroforético com SDS. Uma curva típica é representada na *Figura 2*.

As proteínas padrões utilizadas foram: (citocromo c PM 12.400, SERVA; Mioglobina de cavalo - PM 17.800, SERVA; Quimiotripsinogenio A de pâncreas bovino - PM 25.000, SERVA; Ovoalbumina - PM 45.000, SERVA; Albumina bovina - PM 67.000, SERVA).

Com relação aos três sistemas, foram também empregados géis preparados a 12,5% e 15% com respeito a concentração em acrilamida, no gel separador, utilizando-se tubos e/ou placas verticais de géis:



(b)

Figura 2 - a) Curva típica obtida da eletroforese de proteínas padrões após dissociação.

b) Uma fotografia de um gel típico.

As mobilidades relativas (R_m) dos componentes foram expressas como frações decimais calculadas a partir da relação:

$$\frac{\text{distância do componente à interfase dos géis}}{\text{distância do corante indicador à interfase dos géis}}$$

(Sistemas - DAVIS e LAEMMLI)

$$\frac{\text{distância do componente à interfase dos géis}}{\text{comprimento do gel de pequenos poros}}$$

(Sistema REISFELD)

4. RESULTADOS

Os pesos dos pares de cotilédones de vinte amostras de feijão (*Phaseolus vulgaris*) são mostrados na Table 2.

O peso fresco das amostras variou de 123,4 mg para a cultivar Rico-23 a 472,6 mg para a cv. Pintado.

O peso seco também mostrou uma variação aproximada de 4 vezes, indo de 104,0 mg para a cv. Rico-23 a 401,0 mg para a cv. Pintado. Todavia, com base na porcentagem de peso seco de todas as amostras, elas variaram de $86 \pm 4\%$.

O teor de umidade variou de 10,3% para a cultivar Porrillo, a 17,7% para a cultivar Catu. Embora haja uma relação entre o peso fresco e o peso seco, não houve uma relação simples entre os pesos e o teor de umidade, como por exemplo, as cultivares que apresentaram os limites mínimos e máxi

Tabela 2 - Peso fresco, peso seco e teor de umidade de pares de cotilédones de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

C U L T I V A R E S	PESO FRESCO (mg)	PESO SECO (mg)	PESO SECO* (%)	UMIDADE** (%)
Bico de Ouro	216,8	186,3	85,9	14,1
Roxão	155,2	129,0	83,1	16,9
Aete-3	188,6	162,2	86,0	14,0
Carioca (1)	276,5	237,2	85,8	14,2
Carioca (2)	277,7	238,7	86,0	14,0
Carioca precoce	178,5	150,1	84,1	15,9
Rico-23	123,4	104,0	84,3	15,7
Rosinha G ₂	226,9	192,6	84,8	15,2
Venezuela-350	191,4	164,9	86,2	13,8
Rosinha F79:1-6	226,9	192,6	84,8	15,2
Chumbinho opaco	178,1	151,5	85,0	15,0
Catu	160,1	131,8	82,0	17,7
Iguaçu	147,1	121,5	82,6	17,4
Pirata	216,0	185,5	85,9	14,1
Rosinha F79:109-114	227,0	193,0	85,0	15,0
Porrillo	183,8	164,9	89,7	10,3
Pintado	472,6	401,0	84,8	15,2
Jalo	417,9	357,1	85,4	14,6
Goiano precoce	305,2	263,6	84,8	15,2
Pinto	240,6	215,3	89,5	10,5

$$*\text{Peso seco \%} = \frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

$$**\text{Umidade \%} = \frac{\text{Peso fresco-peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

mos de umidade não diferem muito em relação aos pesos por par de cotilédones.

Os teores de N total das farinhas dos cotilédones que são mostrados na Tabela 3 variaram de 2,94% para a cv. Roxão a 4,14% para a cv. Pintado e os teores de proteína dessas duas cultivares foram 18,38% e 25,88%, respectivamente obtidos pela multiplicação do teor do N total pelo fator 6,25. A proteína extraída pelo tampão tris-glicina com NaCl 2%, pH 8,3 variou de 16,56% da proteína total para a cultivar Roxão, a 24,85% para a cultivar Pintado. A Tabela mostra que mais de 76% (valor obtido para a cultivar Rico-23) da proteína total da farinha foi extraída.

Depois da hidrólise ácida das farinhas de doze amostras, entre 80% e 96% do peso da proteína de cada amostra foi recuperado como aminoácidos e amônia (Tabela 4a) e nenhuma diferença significativa na composição foi detectada entre as amostras. Aproximadamente 25% (p/p) da proteína de cada amostra foi recuperada como ácido aspártico e glutâmico e quase 20% foi recuperada como aminoácidos básicos com lisina apresentando a mais alta concentração, em contraposição, menos do que 3% da proteína foi recuperada como tirosina e menos do que 0,5% como metionina.

Em bases molares (Tabela 4b) aproximadamente

Tabela 3 - Nitrogênio total, proteína total, proteína solúvel e porcentagem de extração da farinha de cotilédones de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

C U L T I V A R E S	NITROGÊNIO TOTAL		PROTEÍNA TOTAL		PROTEÍNA EXTRAÍDA	
	g/100 g farinha	g/100 g farinha	g/100 g farinha	g/100 g farinha	g/100 g farinha	g/100 g proteína total
Bico de Ouro	3,64	22,75	22,60	99		
Roxão	2,94	18,38	16,56	90		
Aete-3	3,15	19,69	17,94	91		
Carioca (1)	3,51	21,94	20,70	94		
Carioca (2)	3,15	19,69	19,49	99		
Carioca precoce	3,08	19,25	17,87	93		
Rico-23	3,71	23,19	17,76	76		
Rosinha G ₂	3,92	24,50	24,85	101		
Venezuela-350	3,64	22,75	21,40	94		
Rosinha F79:1-6	3,35	20,94	18,14	87		
Chumbinho opaco	3,43	21,44	20,70	96		
Catu	3,14	19,62	17,94	91		
Iguaçu	3,43	21,44	20,70	96		
Pirata	3,15	19,69	18,64	95		
Rosinha F79:109-114	3,91	24,44	20,40	83		
Porrillo	3,45	21,56	21,00	97		
Pintado	4,14	25,88	24,85	96		
Jalo	3,41	21,31	20,70	97		
Goiano precoce	3,92	24,50	24,16	99		
Pinto	3,60	22,50	22,60	100		

Tabela 4a. - Teores de aminoácidos e amônia de hidrolizados de farinhas de cotilédones de feijão (g/100 g proteína).

AMINOÁCIDOS	BICO DE ROXÃO		CARIOCA		CARIOCA		RICO		ROSINHA		VENEZUE		ROSINHA		IGUAÇU		PIRATÁ		ROSINHA		GOIANO		
	OURO	(2)	(2)	PRECOCE	23	G ₂	LA - 350	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6	F79:1-6
Lisina	9,09	8,45	8,26	7,26	7,91	8,00	8,36	8,09	7,97	8,01	7,81	8,19	8,01	7,97	8,01	7,81	8,19	8,01	7,97	8,01	7,81	8,19	
Histidina	3,98	4,04	3,85	3,10	3,60	3,55	3,82	3,50	3,50	3,81	3,55	3,73	3,81	3,50	3,81	3,55	3,73	3,81	3,50	3,81	3,55	3,73	
Amônia	4,39	3,66	4,01	3,30	3,96	3,49	3,98	3,98	3,40	3,84	4,22	3,51	3,84	3,40	3,84	4,22	3,51	3,84	3,40	3,84	4,22	3,51	
Arginina	4,42	5,28	4,52	4,62	5,14	4,62	5,73	5,07	5,52	4,61	5,42	5,63	4,61	5,52	4,61	5,42	5,63	4,61	5,52	4,61	5,42	5,63	
Ác. Aspártico	11,66	12,30	11,36	11,55	10,98	11,70	11,92	12,08	12,65	11,79	10,19	11,77	11,79	12,65	11,79	10,19	11,77	11,79	12,65	11,79	10,19	11,77	
Treonina	3,53	3,20	3,23	3,09	3,10	3,60	3,07	3,43	2,86	2,72	2,93	3,51	2,72	2,86	2,72	2,93	3,51	2,72	2,86	2,72	2,93	3,51	
Serina	3,99	3,10	3,15	2,58	3,22	3,18	3,61	3,15	2,79	2,19	2,64	3,97	2,19	2,79	2,19	2,64	3,97	2,19	2,79	2,19	2,64	3,97	
Ác. glutâmico	13,18	14,94	14,78	13,07	13,74	14,06	14,57	15,20	13,78	16,77	11,77	16,16	16,77	13,78	16,77	11,77	16,16	16,77	13,78	16,77	11,77	16,16	
Prolina	4,27	3,92	4,01	3,78	3,63	4,43	4,15	3,91	3,65	3,91	4,80	4,35	3,91	3,65	3,91	4,80	4,35	3,91	3,65	3,91	4,80	4,35	
Glicina	4,20	4,27	4,41	3,90	3,87	4,20	4,04	4,07	3,94	2,53	3,97	4,15	2,53	3,94	2,53	3,97	4,15	2,53	3,94	2,53	3,97	4,15	
Alanina	4,12	4,38	4,09	4,12	3,83	4,14	3,92	3,92	4,02	3,97	3,51	4,21	3,97	4,02	3,97	3,51	4,21	3,97	4,02	3,97	3,51	4,21	
Valina	5,58	5,76	5,15	5,52	5,40	5,78	5,36	5,65	5,58	5,22	5,02	5,83	5,22	5,58	5,22	5,02	5,83	5,22	5,58	5,22	5,02	5,83	
Metionina	0,21	0,30	0,17	0,30	0,38	0,34	0,21	0,26	0,17	0,26	0,09	0,34	0,26	0,17	0,26	0,09	0,34	0,26	0,17	0,26	0,09	0,34	
Isoleucina	4,53	4,46	4,19	4,04	4,17	4,23	4,24	4,30	4,38	3,97	3,86	4,65	3,97	4,38	3,97	3,86	4,65	3,97	4,38	3,97	3,86	4,65	
Leucina	7,18	7,20	7,07	6,59	6,80	9,67	7,09	7,19	6,96	6,82	6,37	7,43	6,82	6,96	6,82	6,37	7,43	6,82	6,96	6,82	6,37	7,43	
Tirosina	2,17	1,35	2,07	1,29	1,76	1,60	1,71	1,65	1,24	1,14	1,66	2,44	1,24	1,24	1,14	1,66	2,44	1,24	1,24	1,14	1,66	2,44	
Fenilalanina	5,75	5,48	5,28	5,14	5,44	5,42	5,67	5,52	5,61	5,19	5,14	6,19	5,61	5,61	5,19	5,14	6,19	5,61	5,61	5,19	5,14	6,19	
TOTAL	92,27	92,11	89,60	83,25	86,91	92,00	91,45	90,98	88,02	79,94	82,94	96,01	79,94	88,02	79,94	82,94	96,01	79,94	88,02	79,94	82,94	96,01	96,01

Tabela 4b - Teores de aminoácidos e de amônia de hidrolizados de farinhas de cotilédones de feijão. (moles/100 moles de aminoácidos recuperados).

AMINOÁCIDOS	BICO DE OURO	ROXÃO	CARIOCA (2)	CARIOCA PRECOCE	RICO 23	ROSINHA G ₂	VENEZUELA - 350	ROSINHA F79:1-6	IGUAÇU	PIRATÁ	ROSINHA F79:109-114	COLANG PRECOCE
Lisina	9,11	8,43	8,51	7,99	8,45	8,20	8,48	8,24	8,34	8,69	8,77	7,87
Histidina	3,76	3,80	3,74	3,21	3,63	3,42	3,65	3,35	3,45	3,89	3,75	3,37
Amônia	37,79	31,39	35,45	31,22	36,31	30,67	34,65	34,82	30,62	35,78	40,74	28,97
Arginina	3,72	4,42	3,91	4,27	4,60	3,97	4,88	4,33	4,85	4,21	5,11	4,53
Ác. aspártico	12,83	13,48	12,85	13,96	12,88	13,16	13,27	13,50	14,55	14,04	12,56	12,40
Treonina	4,35	3,92	4,08	4,18	4,07	4,53	3,82	4,29	3,67	3,62	4,03	4,13
Serina	5,56	4,30	4,51	3,95	4,79	4,53	5,09	4,46	4,06	3,31	4,13	5,30
Ác. glutâmico	13,13	14,82	15,13	14,28	14,58	14,31	14,67	15,37	14,33	18,07	13,13	15,41
Prolina	5,43	4,97	5,24	5,28	4,92	5,77	5,34	5,05	4,85	5,39	6,84	5,30
Glicina	8,19	8,31	8,85	8,36	8,05	8,37	7,97	8,07	8,04	5,34	8,67	7,74
Alanina	6,77	7,18	6,92	7,44	6,71	6,96	6,53	6,54	6,90	7,07	6,47	6,62
Valina	6,98	7,18	6,62	7,58	7,20	7,39	6,79	7,18	7,30	7,06	7,03	6,98
Metionina	0,21	0,29	0,17	0,32	0,40	0,34	0,21	0,25	0,17	0,27	0,09	0,32
Isoleucina	5,06	4,96	4,81	4,96	4,96	4,83	4,79	4,88	5,11	4,80	4,83	4,98
Leucina	8,03	8,01	8,12	8,08	8,09	7,99	8,02	8,15	8,13	8,24	7,97	7,95
Tirosina	1,76	1,08	1,72	1,15	1,52	1,32	1,40	1,36	1,09	0,99	1,50	1,89
Fenilalanina	5,10	4,84	4,81	5,00	5,14	4,91	5,02	4,97	5,20	4,98	5,11	5,22
TOTAL	137,78	131,38	135,44	131,23	136,30	130,67	134,64	134,81	130,66	135,75	140,74	128,97

27% dos aminoácidos foram derivados a partir dos ácidos dicarboxílicos ou suas amidas (asparagina e glutamina), 15% foram aminoácidos básicos, 2% ou menos foi tirosina e menos do que 0,5% foi metionina.

Cerca de 4% do peso total recuperado foi amônia que representou aproximadamente 140 moles/100 moles de ácidos dicarboxílicos.

A capacidade dos extratos de aglutinarem eritrócitos de vários animais é mostrada na Tabela 5a. Uma grande diferença nas capacidades de aglutinação foi detectada tanto entre cultivares como entre os tipos de eritrócitos. Todavia, nenhum dos extratos aglutinou eritrócitos de vaca não tratados e o extrato da cv. Pinto não aglutinou nenhum dos tipos de eritrócitos testados. A menor variação dos títulos de aglutinação foi obtida contra eritrócitos humanos variando de 16 a 64 e a maior, de 4 a 2048 foi obtida contra eritrócitos de vaca tratados com tripsina (eritrócitos-VTT). Os títulos obtidos com os eritrócitos-VTT foram usados como base para ordenar as cultivares nas Tabelas.

Os extratos das cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce foram mais ativos contra os eritrócitos-VTT do que os outros extratos e os extratos das cultivares Chumbinho opaco, Catu, Iguaçu, Piratã, Porrillo e a linhagem F79:109-114

Tabela 5a - Títulos de aglutinação do extrato da farinha cotiledonar das cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

CULTIVARES	VACA	VACA TRIPSINA	HUMANO	COELHO	CARNEIRO	CARNEIRO PRONASE
Bico de Ouro	an*	4	64	32	16	256
Roxão	an	4	32	32	4	64
Aete-3	an	8	64	64	8	256
Carioca (1)	an	8	64	64	8	256
Carioca (2)	an	8	64	64	8	256
Carioca precoce	an	8	32	64	32	1024
Rico-23	an	16	64	64	8	256
Rosinha G ₂	an	32	64	64	16	1024
Venezuela-350	an	32	32	16	4	1024
Rosinha F79:1-6	an	64	64	64	64	1024
Chumbinho opaco	an	128	32	64	16	1024
Catu	an	128	32	64	32	1024
Iguaçu	an	128	32	64	64	512
Pirataã	an	256	64	128	256	1024
Rosinha F79:109-114	an	256	64	256	32	256
Porrillo	an	256	16	16	8	512
Pintado	an	1024	32	256	32	4096
Jalo	an	2048	32	64	64	4096
Goiano precoce	an	2048	16	64	64	4096
Pinto	an	an	an	an	an	an

Os títulos foram obtidos com o inverso da última diluição dos extratos que produziu aglutinação.

*Agglutinação negativa

da cv. Rosinha foram intermediárias nas suas atividades entre aquelas três cultivares e as cultivares Bico de ouro, Roxão, Aetê-3, Carioca-1, Carioca-2, Carioca precoce, Rico-23, Rosinha G₂; Venezuela-350 e a linhagem F79: 1-6 da cv. Rosinha. Nenhuma cultivar ou grupos de cultivares pode ser separada com base na aglutinação contra eritrócitos humanos e de coelho, e apenas a cv. Piratã aparece diferente contra eritrócitos de carneiro.

Todavia, quando os extratos foram testados contra eritrócitos de carneiro tratados com pronase (eritrócitos-CTP), os extratos das cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce deram títulos distintamente superiores (4096) do que os outros extratos. De fato, esses títulos foram os maiores obtidos em todos os testes, sendo duas vezes maior do que o título mais alto obtido contra eritrócitos-VTT.

Entre as amostras examinadas existem duas amostras de Carioca e uma amostra de Carioca precoce, que foi desenvolvida a partir da cv. Carioca após tratamento por radiação gama, e amostras de três linhagens de Rosinha. Nenhuma diferença nas atividades aglutinantes foi encontrada entre as duas amostras da cv. Carioca e a amostra de Carioca precoce diferiu daquelas amostras apenas contra os eritrócitos de carneiro tratados e não tratados, mostrando atividades aglutinan

tes maiores. Duas das linhagens de Rosinha, a G₂ e a F79:1-6 também mostraram atividades aglutinantes semelhantes, exceto possivelmente, contra eritrócitos de carneiro não tratados. A atividade aglutinante da linhagem Rosinha F79:109-114 contra eritrócitos-VTT e de coelho foi maior e contra eritrócitos-CTP foi menor do que as atividades correspondentes às outras duas linhagens de Rosinha, todavia a atividade aglutinante contra eritrócitos-VTT foi substancialmente menor do que as atividades aglutinantes das cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce contra eritrócitos-VTT.

Exceto para a cv. Porrillo, a distinção entre os três grupos de cultivares observada nos dados referentes aos eritrócitos-VTT é talvez mais evidente quando os títulos obtidos contra eritrócitos-VTT são relacionados com aqueles obtidos contra eritrócitos humanos ou de coelho (Tabela 5b). Dessa forma, a cv. Porrillo parece mais semelhante às cvs. Pintado, Jalo e Goiano precoce do que com as cultivares intermediárias, uma vez que as quatro cultivares mostraram valores distintamente altos. Essa semelhança também aparece quando a comparação é feita contra eritrócitos não tratados de carneiros. Entretanto, com esse tipo de eritrócitos somente as quatro cultivares que apresentaram valores altos puderam ser separadas e nenhum grupo de cultivares intermediárias pode ser distinguido.

Tabela 5b - Relações entre os títulos obtidos contra eritrócitos de vacas tratados com tripsina e os títulos obtidos contra os outros eritrócitos.

C U L T I V A R E S	TÍTULO VTT	TÍTULO VTT	TÍTULO VTT	TÍTULO VTT
	TÍTULO HUMANO	TÍTULO COELHO	TÍTULO CARNEIRO	TÍTULO CTP
Bico de Ouro	0,062	0,125	0,250	0,016
Roxão	0,012	0,125	1,000	0,060
Aete-3	0,125	0,125	1,000	0,032
Carioca (1)	0,125	0,125	1,000	0,032
Carioca (2)	0,125	0,125	1,000	0,032
Carioca precoce	0,250	0,125	0,250	0,008
Rico-23	0,250	0,250	2,000	0,060
Rosinha G ₂	0,500	0,500	2,000	0,032
Venezuela-350	1,000	2,000	8,000	0,032
Rosinha F79:1-6	1,000	1,000	1,000	0,064
Chumbinho opaco	4,000	2,000	8,000	0,128
Catu	4,000	2,000	4,000	0,128
Iguaçu	4,000	2,000	2,000	0,250
Pirata	4,000	2,000	1,000	0,250
Rosinha F79:109-114	4,000	1,000	8,000	1,000
Porrillo	16,000	16,000	32,000	0,500
Pintado	32,000	4,000	32,000	0,250
Jalo	64,000	32,000	32,000	0,500
Goiano precoce	128,000	32,000	32,000	0,500
Pinto	0,000	0,000	0,000	0,000

VTT = eritrócitos de vaca tratados com tripsina.

CTP = eritrócitos de carneiro tratados com pronase.

Quando a relação entre os títulos dos eritrócitos-VTT e eritrócitos-CTP foi calculada, uma série contínua de valores foi obtida não permitindo uma separação clara de qualquer grupo de cultivares.

As relações entre as atividades aglutinantes contra eritrócitos-VTT e as atividades aglutinantes contra os outros tipos de eritrócitos foram semelhantes para as duas amostras de cv. Carioca, como foram as linhagens G₂ e F79:1-6 de Rosinha. As relações entre eritrócitos-VTT e humanos, carneiro e CTP para a linhagem F79:109-114 de Rosinha foram individualmente bem maiores do que aquelas das outras duas linhagens de Rosinha.

A Tabela 6 mostra as concentrações mínimas de proteína nos extratos que foram requeridas para produzir aglutinação detectável. Os valores mostram que a sensibilidade da proteína num extrato, de qualquer uma das cultivares, diferiu com o tipo dos eritrócitos utilizados. Por exemplo, uma concentração mínima de 1,4 mg de proteína por ml foi necessária para aglutinação de eritrócitos-VTT pela proteína da cv. Bico de ouro enquanto que apenas 20 µg de proteína por ml foi requerida quando eritrócitos-CTP foram usados. Uma variação ainda maior na sensibilidade foi encontrada entre as cultivares quando seus extratos foram testados contra eritrócitos-VTT,

Tabela 6 - Concentrações mínimas de proteína nos extratos que produziram aglutina-
ção.

CULTIVARES	PROTEÍNA NO EXTRATO (mg/ml)	CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS. (µg/ml)					CARNEIRO PRONASE
		VACA TRIPSINA	HUMANO	COELHO	CARNEIRO	CARNEIRO	
Bico de Ouro	5,65	1408	88	177	353	22	
Roxão	4,14	1031	129	129	1031	65	
Aete-3	4,48	562	70	70	562	18	
Carioca (1)	5,18	649	81	81	649	20	
Carioca (2)	4,87	610	76	76	610	19	
Carioca precoce	4,47	559	140	70	140	4	
Rico-23	4,44	277	69	70	556	17	
Rosinha G ₂	6,21	194	97	97	388	6	
Venezuela-350	5,35	167	167	334	1333	5	
Rosinha F79:1-6	4,53	71	71	71	71	4	
Chumbinho opaco	5,18	40	162	81	324	5	
Catu	4,48	35	140	70	140	4	
Iguaçu	5,18	40	162	81	81	10	
Pirata	4,66	18	73	36	18	5	
Rosinha F79:109-114	5,10	20	80	20	159	20	
Porriilo	5,25	20	328	328	658	10	
Pintado	6,21	6	194	24	194	2	
Jalo	5,18	3	162	81	81	1	
Goiano precoce	6,04	3	377	94	94	1	

apenas 3 μg de proteína por ml foi necessária quando os extratos das cv. Jalo e Goiano precoce foram examinados comparado com 1,4 mg de proteína por ml quando o extrato da cv. Bico de ouro foi testada.

Essa Tabela reflete ainda, melhor as semelhanças e diferenças entre as amostras vistas nas Tabelas 5. Então, uma menor concentração de proteína para as cv. Pintado, Jalo e Goiano precoce, foi necessária para aglutinação de eritrócitos-VTT e eritrócitos-CTP em comparação as concentrações de proteína das outras cultivares.

Os valores obtidos para as cultivares Chumbinho opaco, Catu, Iguaçu, Piratã, Porrillo e a linhagem F79:109-114 da cv. Rosinha foram intermediários entre aquelas três cultivares e as restantes com relação aos eritrócitos-VTT mas não aos eritrócitos-CTP. Também não houve diferença aparente entre as duas amostras da cv. Carioca. Para duas linhagens da cv. Rosinha, a concentração mínima necessária para aglutinar cada tipo de eritrócito humano, coelho, carneiro e eritrócitos-CTP não diferiu significativamente (isto é, semelhante a Tabela 5), todavia enquanto um valor de 190 $\mu\text{g}/\text{ml}$ foi obtido para aglutinação de eritrócitos-VTT pela linhagem G₂, o valor obtido para a linhagem F79:1-6 foi apenas 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A concentração mínima de proteína necessária para aglutinar eritrócit^os-VTT, eritrócitos-CTP pela terceira amostra de Rosinha,

a linhagem F79:109-114 foi claramente diferente daquelas calculadas para as outras duas linhagens desta cultivar.

Na Tabela 7 o peso mínimo de proteína necessária para produzir aglutinação visível foi calculada.

Os valores indicam que não mais que 35,1 μg de proteína de qualquer cultivar, exceto para a cv. Pinto, foi necessária para aglutinação de qualquer um dos tipos de eritrócitos usados. Apenas 30 ng de proteína das cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce foram necessárias para produzir aglutinação visível de eritrócitos-CTP e menos que 75 ng de proteína dessas três cultivares aglutinaram eritrócitos-VTT. Vinte vezes mais que essa quantidade de proteína foi requerida para aglutinar eritrócitos-VTT pelas cultivares numeradas de 1-10 na Tabela, enquanto que quantidades entre esses dois níveis (75 ng e 1,5 μg) foram suficientes quando proteínas das outras cultivares foram testadas contra este tipo de eritrócito.

As quantidades de proteína necessárias para aglutinar tanto eritrócitos humanos como de coelho variaram de 1,73 μg a 9,44 μg e 0,5 μg a 8,36 μg , respectivamente. Para contrastar, uma grande variação (0,4 μg a 33 μg) foi encontrada entre as cultivares quando testadas contra eritrócitos não tratados de carneiro; entretanto, essa variação não permitiu

Tabela 7 - Peso mínimo (μg) de proteína (em 25 μl) que dá a-glutinação detectável em 25 μl de suspensão eritrocitária à 4%.

CULTIVARES	VACA TRIPSINA	HUMANO	COELHO	CARNEIRO	CARNEIRO PRONASE
1- Bico de Ouro	35,10	2,21	2,21	8,83	0,55
2- Roxão	25,90	3,23	3,23	25,88	1,62
3- Aete-3	14,00	1,75	1,75	14,00	0,44
4- Carioca (1)	16,20	2,02	2,02	16,19	0,51
5- Carioca (2)	15,20	1,90	1,90	15,22	0,48
6- Carioca precoce	14,00	3,49	1,75	3,49	0,11
7- Rico-23	06,94	1,73	1,73	13,88	0,43
8- Rosinha G ₂	04,85	2,42	2,42	9,70	0,15
9- Venezuela-350	04,18	4,18	8,36	33,44	0,13
10- Rosinha F79:1-6	01,77	1,77	1,77	1,77	0,11
11- Chumbinho opaco	01,01	4,05	2,02	8,09	0,13
12- Catu	00,87	3,50	1,75	3,50	0,11
13- Iguaçu	01,01	4,05	2,02	2,02	0,25
14- Piratã	00,45	1,82	0,91	0,46	0,11
15- Rosinha F79:109-114	00,50	1,99	0,50	3,98	0,50
16- Porrillo	00,51	8,20	8,20	16,41	0,26
17- Pintado	00,015	4,85	0,61	4,85	0,04
18- Jalo	00,063	4,05	2,02	2,02	0,03
19- Goiano precoce	00,074	9,44	2,36	2,36	0,04

uma separação clara para nenhum grupo de cultivares.

A eletroforese dos extratos, sob condições ácidas não dissociantes, forneceu perfís protéicos compostos de diversas bandas. Uma fotografia de um gel típico, é mostrada na Figura 3A, um diagrama dos quinze diferentes tipos de perfís obtidos das vinte amostras e o perfil de uma preparação comercial de lectina de "*red kidney bean*" (PHA), são mostrados na Figura 3B. Em cada um desses perfís, quatro grupos de bandas protéicas puderam ser vistas, e esses grupos foram designados de A, B, C e D na Figura 3B. Em todos os perfís, o primeiro grupo (A) foi composto de uma banda larga e intensamente corada, acompanhada de outras duas bandas, todas com mobilidades muito baixas. O segundo grupo (B) foi composto de proteínas com mobilidades comparáveis com aquelas de isolectinas da PHA e a composição desse grupo variou entre as amostras. Proteínas com mobilidades iguais a cada uma das cinco isolectinas observadas no perfil da PHA foram vistas apenas nos perfís das cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce. A banda mais proeminente nos perfís dessas cvs. e em PHA foi a de nº 5. Entretanto as intensidades relativas das outras quatro bandas tipo isolectinas nos perfís dessas três cultivares não foram as mesmas que na PHA. Os perfís das outras cultivares não contiveram mais que quatro bandas neste grupo de "*isolectinas*". A banda nº 4 na Figura 3B foi proeminente em

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

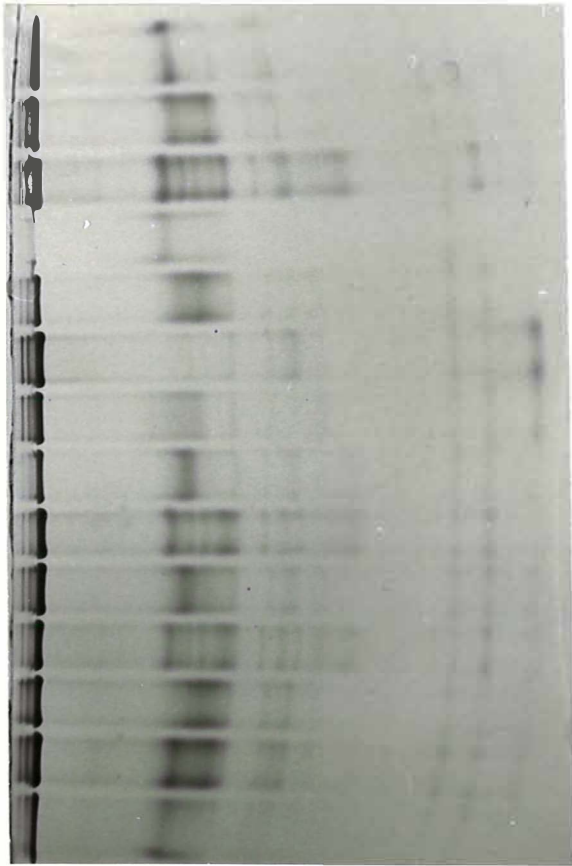


Figura 3 A -. Uma fotografia de um gel típico obtido após eletroforese dos extratos sob condições ácidas.

- 1) Rosinha F79:1-6; 2) Rosinha G₂; 3) Rosinha F79:109-114;
- 4) Pintado; 5) Chumbinho; 6) Jalo; 7) Aete; 8) Porrillo;
- 9) Pinto; 10) Piratã; 11) PHA; 12) Goiano precoce; 13) Carioca precoce; 14) Carioca (1).

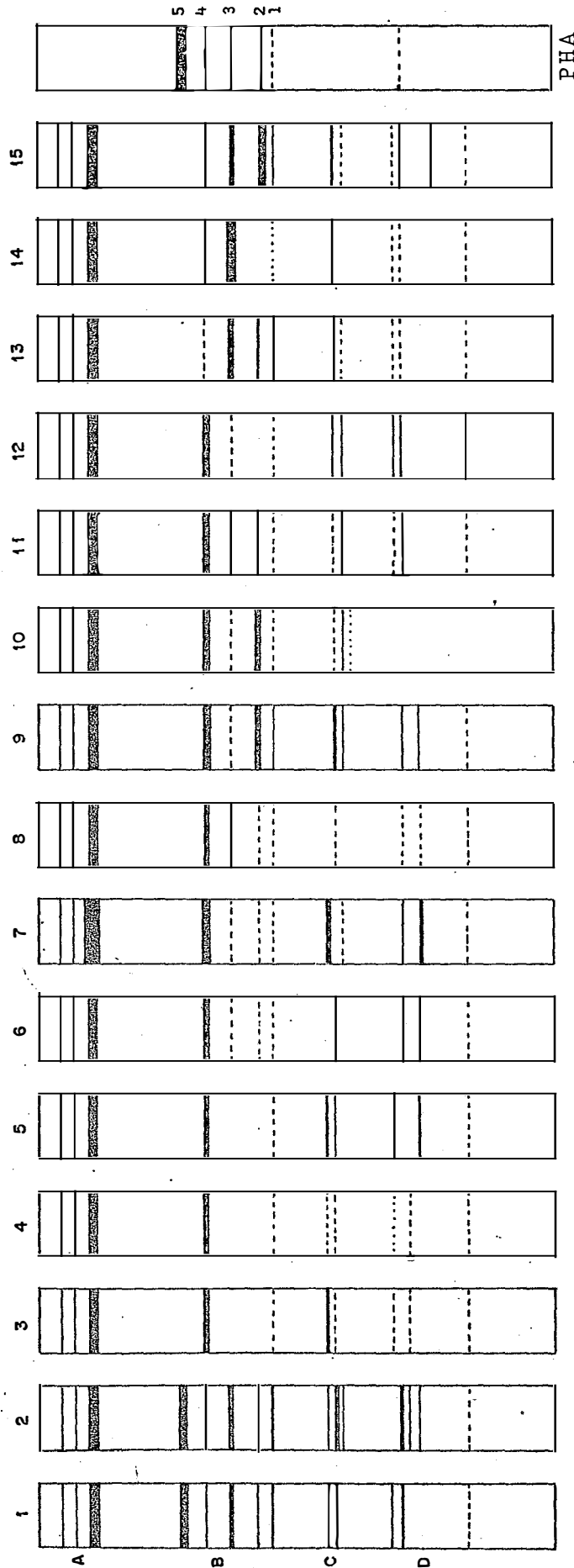


Figura 3B - Perfis protéicos dos extratos de vinte amostras de *Phaseolus vulgaris* e de uma PHA comercial obtidos por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a pH ácido.

- 1) Jalo e Pintado; 2) Goiano precoce; 3) Chumbinho opaco; 4) Catu; 5) Venezuela-350;
- 6) Carioca (1), Carioca (2), Aete-3, Roxão e Bico de ouro; 7) Rico-23; 8) Rosinha F79:1-6; 9) Rosinha G₂; 10) Carioca precoce; 11) Iguaçu; 12) Piratã; 13) Rosinha F79:109-114; 14) Porrillo; 15) Pinto; 16) PHA.

todos os perfís, exceto para as cv. Pinto, Porrillo é a linhagem Rosinha F79:109-114, e ela foi acompanhada por uma segunda banda proeminente (nº 2) somente nos perfís da linhagem Rosinha G₂ e na cultivar Carioca precoce.

O componente proeminente no grupo da linhagem Rosinha F79:109-114, e da cultivar Porrillo, foi a banda nº 3, e esta banda foi apenas ligeiramente menos proeminente nos perfís das cultivares Pintado, Jalo, Goiano precoce e Pinto.

No perfil da cultivar Pinto, a banda nº 2 foi o principal componente visto no grupo. A banda nº 1 foi detectada em todos os perfís, embora fracamente corada, exceto nas cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce.

No grupo de bandas designado C na Figura 3B, onze cultivares apresentaram duas bandas com diferentes intensidades, de acordo com a cultivar examinada. Apenas duas cultivares, Goiano precoce e Carioca precoce apresentaram nesse grupo três bandas sendo a intermediária de maior intensidade, embora na cultivar Carioca precoce as outras duas tenham sido de muito fraca coloração. Somente uma banda neste grupo pode ser observada para as cvs. Carioca 1 e 2, Aeté-3, Roxão, Bico de ouro e Porrillo e a linhagem Rosinha F79:1-6.

Exceto para as cvs. Goiano precoce, Pinto e Carioca precoce, três bandas foram detectadas na região assi-

nalada D. No perfil das cvs. Goiano precoce e Pinto, quatro bandas foram vistas nesta região, enquanto que na cultivar Carioca precoce, nenhuma banda foi visível.

As eletroforeses dos extratos sob condições alcalinas não dissociantes também mostraram perfis protéicos compostos de diversas bandas, nove diferentes perfis foram obtidas das vinte amostras e de uma PHA, e estão mostrados em fotografia na Figura 4A e em diagrama na Figura 4B. As principais características que diferenciam os perfis estão resumidas na Tabela 8. Os nove perfis diferiram um dos outros com respeito a diversas bandas situadas em quatro regiões dos géis.

A característica mais predominante de cada um dos perfis foi uma banda larga, intensivamente corada que migrou com mobilidade relativa média $R_m = 0,21 \pm 0,01$. Entretanto as mobilidades desse componente não foram idênticas entre as amostras e para as cvs. Pintado, Jalo e Goiano precoce, elas foram ligeiramente maiores ($R_m = 0,22$) do que para as outras cultivares ($R_m = 0,20$).

Na região correspondente a R_m s 0,08 a 0,10 quatro bandas foram observadas nos perfis das cultivares Catu, Iguaçu, Piratã e Rosinha F79:109-114, não mais que três bandas foram detectadas nesta região em qualquer dos perfis das outras amostras. Três bandas foram vistas claramente nas cul

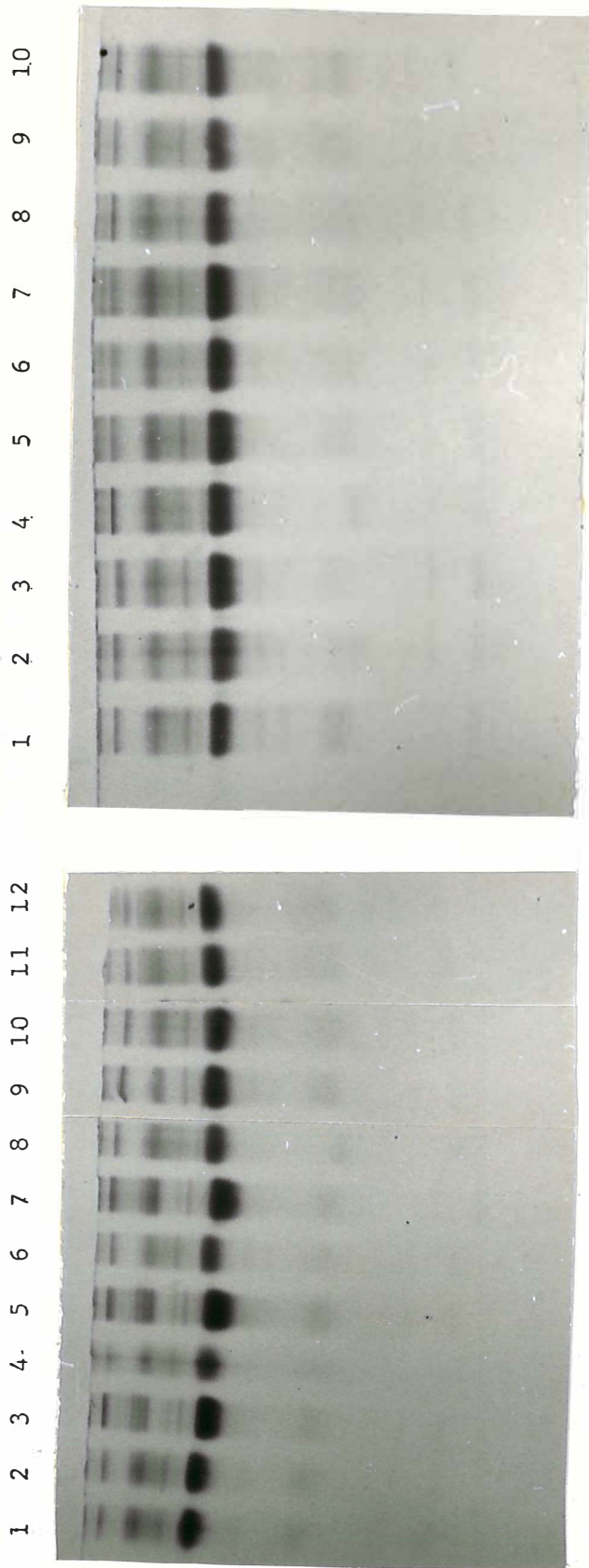


Figura 4A - Fotografias de géis típicos obtidos após eletroforese dos extratos sob condições alcalinas.

- 1) Aete; 2) Aete; 3) Jalo; 4) Roxão; 5) Goiano precoce; 6) Carioca (2); 7) Pintado; 8) Carioca precoce; 9) Pinto; 10) Chumbinho; 11) Catu; 12) Catu.
- 1) Carioca (1); 2) Porrillo; 3) Rico-23; 4) Rosinha G2; 5) Bico de Ouro; 6) Venezuela-350; 7) Iguaçú; 8) Piratã; 9) Rosinha F79:1-6; 10) Rosinha F79:109-114.

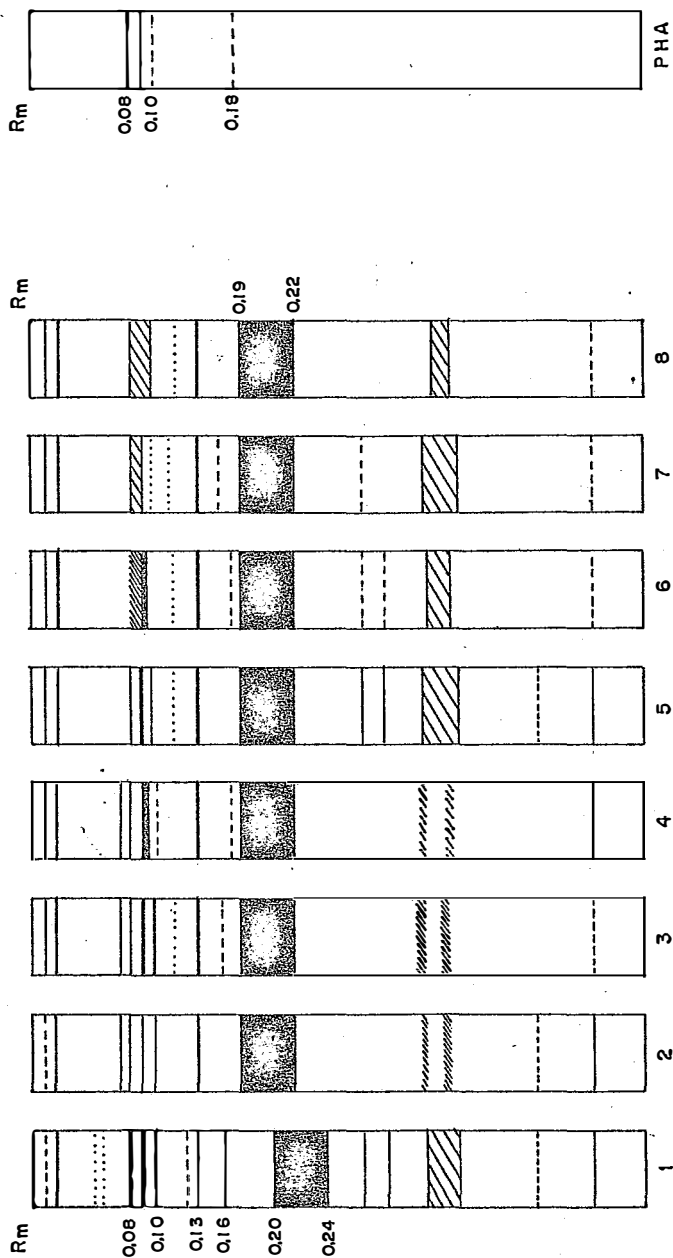


Figura 4B - Perfis protéicos dos extratos de vinte amostras de *Phaseolus vulgaris* e de uma PHA comercial, obtidas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a pH alcalino.

- 1) Pintado, Jalo e Goiano precoce; 2) Catu e Piratã; 3) Iguaçu; 4) Rosinha F79:109-114; 5) Carioca (1), Carioca (2), Rico-23 e Chumbinho opaco; 6) Carioca precoce e Rosinha G2; 7) Bico de ouro; 8) Roxão, Aete, Venezuela-350; Rosinha F79:1-6; Porrillo e Pinto.

Tabela 8 - Resumo das características dos perfis protéicos obtidos por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida em pH alcalino, das vinte amostras de *Phaseolus vulgaris* examinadas.

A M O S T R A S	C A R A C T E R Í S T I C A S						Nº no dia grama
	Proteína principal	R _m ^s	R _m ^m	R _m ^m	R _m ^m	R _m ^m	
Bico de Ouro	R _m ^m médio	0,08 a 0,10	0,13	0,16	0,18		7
Roxão	0,20	n.r.	proem.	fraca	n.d.		8
Aete-3	0,20	n.r.	proem.	n.d.	n.d.		8
Carioca (1)	0,20	n.r.	proem.	n.d.	n.d.		5
Carioca (2)	0,20	3 bandas	proem.	n.d.	n.d.		5
Carioca precoce	0,20	3 bandas	proem.	n.d.	n.d.		6
Rico-23	0,20	3 bandas	proem.	n.d.	p.		5
Rosinha G ₂	0,20	3 bandas	proem.	n.d.	n.d.		6
Venezuela-350	0,20	3 bandas	proem.	n.d.	p.		8
Rosinha F79:1-6	0,20	n.r.	proem.	n.d.	n.d.		8
Chumbinho opaco	0,20	n.r.	proem.	n.d.	n.d.		5
Catu	0,20	3 bandas	proem.	n.d.	n.d.		2
Iguaçu	0,20	4 bandas	proem.	n.d.	n.d.		3
Pirata	0,20	4 bandas	proem.	fraca	n.d.		2
Rosinha F79:109-114	0,20	n.r.	proem.	n.d.	n.d.		4
Porrillo	0,20	4 bandas	proem.	n.d.	p.		8
Pintado	0,22	n.r.	proem.	n.d.	n.d.		1
Jalo	0,22	3 óbvias	fraca	proem.	n.d.		1
Goiano precoce	0,22	3 óbvias	fraca	proem.	n.d.		1
Pinto	0,20	3 óbvias	proem.	proem.	n.d.		8
		n.r.	proem.	n.d.	n.d.		

n.r. = não resolvido.
 proem. = proeminente.
 n.d. = não detectada.
 p. = presente.

tivares Pintado, Jalo e Goiano precoce, enquanto que elas não foram bem resolvidas nos cultivares, Carioca (1), Carioca(2), Carioca precoce, Rico-23, Rosinha G₂, Chumbinho opaco. Essas bandas ocuparam a mesma região do gel (R_m s 0,08 - 0,10) que três das quatro bandas da PHA. Para as outras cultivares não foi possível distinguir claramente perfis precisos em relação às bandas desta mesma região.

Uma banda de R_m 0,13 foi comum em todas as amostras, mas ela foi menos intensamente corada nas cultivares Jalo e Pintado; nessas duas cultivares e nas cultivares Goiano precoce, Bico de ouro e Iguaçu uma outra banda de R_m 0,16 foi observada embora nas cvs. Bico de ouro e Iguaçu ela tenha sido fracamente corada. Nos perfis das linhagens Rosinha F79:109-114 e Rosinha G₂ e na cultivar Carioca precoce foi observada uma banda fraca de mobilidade ligeiramente menor do que a da principal proteína e igual a do componente mas móbil da lectina comercial.

Três grupos de bandas com mobilidades maiores do que a proteína principal também foram observados. Essas bandas foram fracamente coradas e geralmente se apresentaram difusas e através delas nenhuma diferença significativa pode ser detectada entre as amostras.

Cinco tipos de perfis com diversas bandas foram obtidos quando as proteínas dos extratos foram dissocia-

das e examinadas por eletroforese sob condições alcalinas na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Fotografias de géis típicos são apresentadas na Figura 5A e diagramas dos cinco tipos de perfis estão mostrados juntamente com o perfil obtido de PHA na Figura 5B. Pelo menos quinze componentes foram detectados em cada perfil e treze deles estiveram presentes em todos os géis. Um componentes comum correspondeu em mobilidade a banda única obtida no perfil de PHA, que é composta de subunidade de pesos molecularés (PM) 30.000 e 32.000, embora estas não tenham sido resolvidas no gel.

A subunidade protéica mais intensamente corada nos perfis das cvs. Pintado, Jalo e Goiano precoce teve peso molecular aparente (P_{Ma}) de 50.000; esta subunidade foi proximamente acompanhada de três componentes mais fracamente corados com P_{Ma} de 52.000, 49.000 e 46.000. Em contraposição a principal subunidade nos perfis das outras amostras, exceto a cv. Pinto, teve P_{Ma} 49.000 e ela foi acompanhada pelas subunidades de P_{Ma} 52.000 e 46.000. Nesta região do gel, o perfil obtido da cv. Pinto mostrou duas subunidades proeminentes com P_{Ma} 52.000 e 49.000 e duas subunidades fracas com P_{Ma} 50.000 e 46.000.

Os perfis das cvs. Pintado, Jalo e Goiano precoce também diferiram dos outros perfis nas intensidades rela

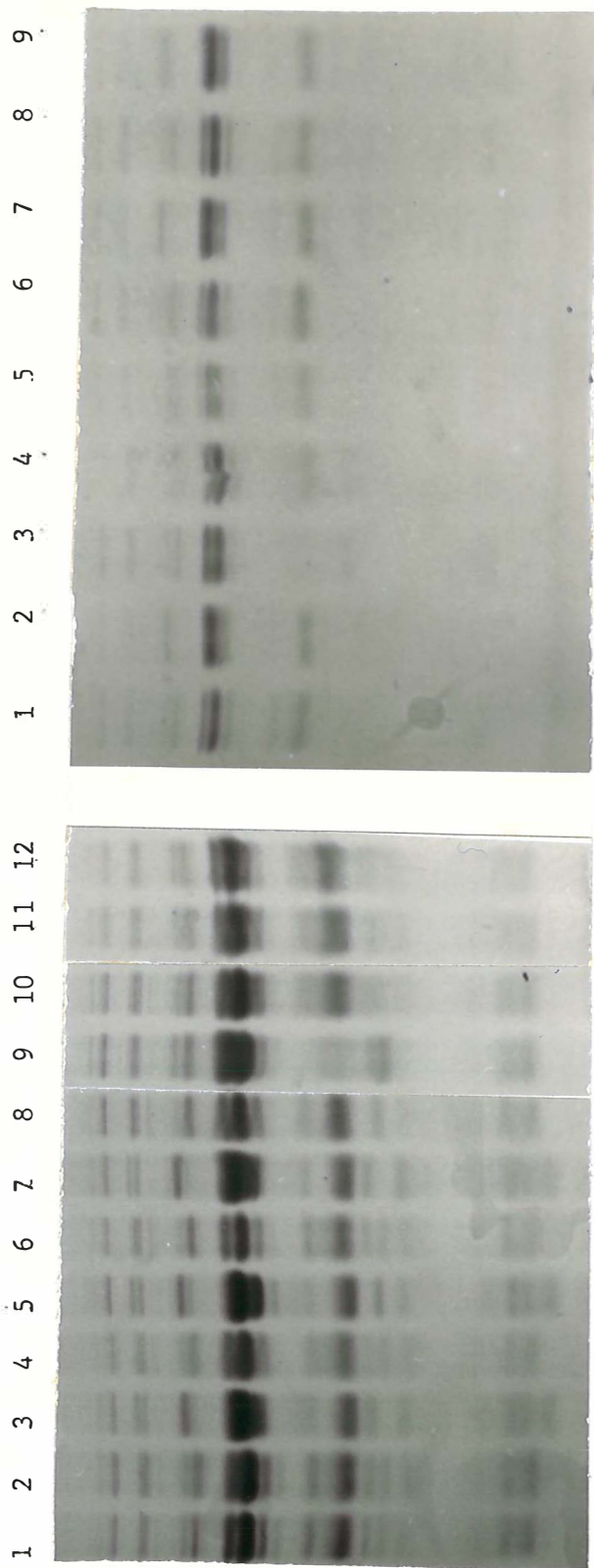


Figura 5A - Fotografias de g~eis t~picos obtidos ap~s eletroforese dos extra-
tos sob condi~oes dissociantes.

1) Aete; 2) Aete; 3) Jalo; 4) Rox~o; 5) Goiano precoce; 6) Cario-
ca (2); 7) Pintado; 8) Carioca precoce; 9) Pinto; 10) Chumbinho;
11) Catu; 12) Catu.

1) Aete; 2) Jalo; 3) Pinto; 4) Porrillo; 5) Carioca (2); 6) Ca-
rioca precoce; 7) Pintado; 8) Chumbinho; 9) Goiano precoce.

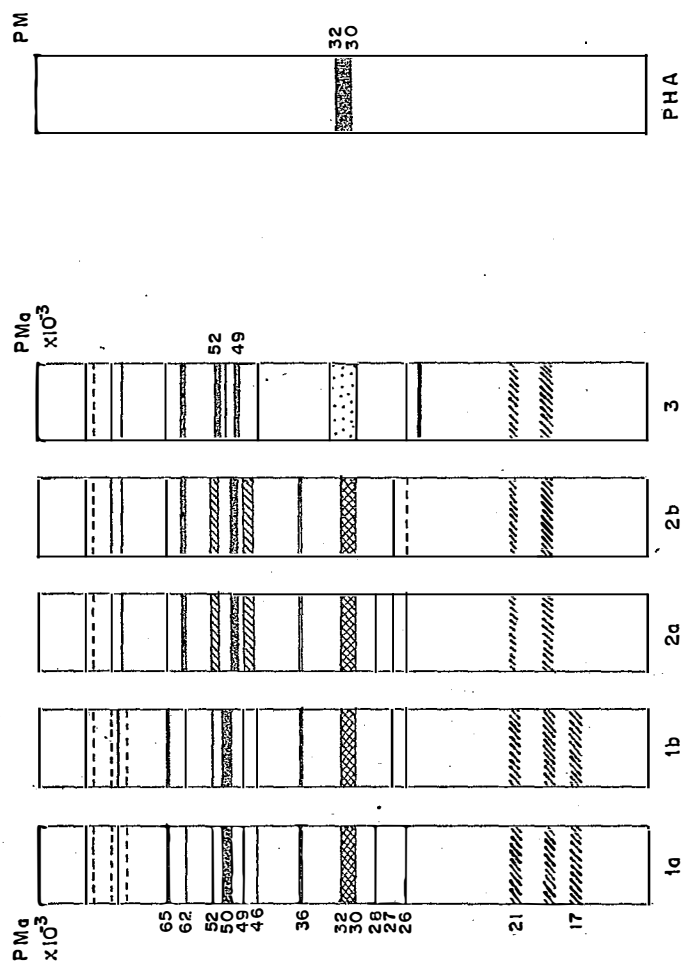


Figura 5B - Perfis polipeptídicos dos extratos de vinte amostras de *Phaseolus vulgaris* e de uma PHA comercial obtidos por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida sob condições dissociantes.

1a) Jalo e Pintado; 1b) Goiano precoce; 2a) Bico de ouro, Roxão, Aete, Carioca (1), Carioca (2), Rico-23, Rosinha G2, Venezuela-350, Rosinha F79:1-6, Chumbinho opaco, Catu, Iguaçu, Piratã, Rosinha F79:109-114 e Porrillo; 2b) Carioca precoce; 3) Pinto.

tivas das duas subunidades comuns, PMa 65.000 e 62.000, e em apresentando uma subunidade de PMa 17.000 que não foi detectada nos outros perfís. Entretanto estas três cultivares não foram idênticas desde que a subunidade de PMa 28.000, não foi detectada no perfil da cv. Goiano precoce e a subunidade de PMa 27.000 não foi detectada nas cvs. Jalo e Pintado. O perfil da cv. Carioca precoce diferiu do perfil 2a no diagrama desde que ele parece não conter o componente de PMa 28.000.

5. DISCUSSÃO

Frequentemente análises bioquímicas de sementes são efetuadas em amostras que não são identificadas precisamente, aparecendo às vezes só o nome da cultura, exemplo feijão, ou o nome comercial, exemplo "*Kidney bean*". Devido a variação natural que pode ocorrer dentro uma cultura, exemplo entre cultivares, a identificação incompleta da amostra tem algumas vezes trazido confusão entre os dados obtidos em diferentes laboratórios (JAFFÉ, 1980). Recentemente tem sido dada uma maior atenção à identificação do material vegetal e, as fontes mais seguras de amostras bem identificadas são as coleções de germoplasmas de instituições agrícolas ou botânicas. Para o presente trabalho, as amostras examinadas foram obtidas de instituições agrícolas bem renomadas. Então, os dados obtidos deveriam ser diretamente comparáveis com dados obtidos no passado ou no futuro de amostras similares, pelo emprego de procedimentos similares.

O método recomendado para a determinação de nitrogênio de farinhas de sementes, e a partir dele proteína, pela Associação de Química Analítica Oficial (AOAC, 1975, 12.^a ed.) é o de Kjeldahl (KEIL e SORMOVA, 1965). Por esse método os teores de N e proteína de muitas amostras de feijão têm sido obtidos em diversos laboratórios (ver por exemplo FAO 1970, TULMANN NETO, 1975; CURY, 1980; CARVALHO, 1981). Os valores de proteína relatados nessas publicações variam de 17% a 30% e os valores obtidos no presente trabalho estiveram dentro deste intervalo. Embora valores para a mesma cultivar nem sempre sejam idênticos entre laboratórios, amostras que dão valores relativamente baixos em um laboratório geralmente apresentam valores baixos em outros laboratórios e o mesmo parece acontecer para amostras com teores relativamente altos de proteína. Então, a concentração relativa de proteína em feijão é provavelmente determinada geneticamente, enquanto que as variações observadas, provavelmente são causadas por fatores ambientais. Entre as amostras examinadas nesse trabalho, as cultivares Pintado, Goiano precoce e as linhagens Rosinha G₂ e Rosinha F79:109-114 podem ser consideradas como cultivares de "alta proteína", enquanto que as cultivares Roxão, Carioca precoce, Catu e Aete-3 são provavelmente cultivares de "baixa proteína".

São numerosos os procedimentos disponíveis para a extração de proteína de plantas (IOFFE *et alii*, 1968;

DAHLGREN *et alii*, 1970; ROYER *et alii*, 1974; ISHINO e ORTEGA, 1975; ITOH *et alii*, 1980; FELSTED *et alii*, 1981). Eles variam de acordo com uma finalidade pré-determinada: uns permitem extrair a máxima proporção da proteína total e há aqueles que visam extrair uma proteína em particular com uma quantidade mínima quanto possível de proteína contaminante. Para o presente trabalho o procedimento escolhido foi por referência a trabalhos publicados (DAHLGREN *et alii*, 1970, FELSTED *et alii*, 1981). Assim foi feito para que os resultados obtidos pudessem ser diretamente comparados com dados obtidos por outros pesquisadores. Muito frequentemente, a porcentagem de extratibilidade relatada em trabalhos publicados não excede a mais que 80% (SGARBIERI, 1979; CURY, 1980; CARVALHO, 1981), enquanto que somente três dos valores apresentados na Tabela 3 foram menores do que 90%. Aparentemente esses valores sugerem que uma extratibilidade excepcionalmente alta foi alcançada no presente trabalho. Entretanto, a exatidão dos valores calculados na Tabela 3 não depende somente da precisão dos valores de proteína nas farinhas discutidos acima, mas também na determinação da proteína extraída. Para essa determinação foi empregado o procedimento colorimétrico de LOWRY *et alii* (1951) que é amplamente utilizado nas análises de proteína solúvel. Entretanto ele foi desenvolvido especificamente para a determinação de proteínas purificadas e é de se esperar que o seu

uso com extratos brutos, que incluem uma variedade de compostos não protéicos como por exemplo carboidratos, gordura, ácidos nucleicos e sais minerais trouxessem alguma inexatidão. Além disso, o cálculo do teor protéico é ou deveria ser sempre efetuado por referência a resultado obtido de ensaio simultâneo de uma proteína padrão de pureza conhecida. Então, a exatidão dos resultados pode ser afetada pela escolha da proteína padrão e do seu grau real de pureza no tempo em que ela é usada que pode não ser o mesmo que o declarado pelo fabricante. Desde que essas considerações podem ser aplicadas tanto a dados relatados por outros investigadores como para os apresentados na Tabela 3, parece provável que a extratibilidade alcançada nesse trabalho em geral pelo menos não foi menor do que aquela alcançada por outros autores (PUSZTAI, 1966; RACUSEN e FOOTE, 1971; SGARBIERI, 1979; CARVALHO, 1981). A relativa baixa extratibilidade apresentada pela amostra da cv. Rico-23 presumivelmente seja devida a uma composição muito diferente dos componentes não protéicos da amostra comparada com a das outras amostras; talvez deva ser notado que as sementes de Rico-23 tiveram o menor peso entre todas as amostras examinadas. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de que a baixa extratibilidade dessa cultivar tenha sido resultado de erros técnicos.

Uma recuperação incompleta do material inicial

é também comumente encontrada durante análises da composição em aminoácidos da proteína da farinha. A perda aparente de aminoácidos resulta principalmente de uma degradação excessiva de resíduos durante a hidrólise, por exemplo, serina, ácido glutâmico (HILL, 1965). Dados com alta precisão podem somente ser obtidos através de análises de alíquotas da mesma amostra hidrolizada por diferentes tempos e isto naturalmente aumenta consideravelmente o custo da análise. Um segundo fator que contribui para uma perda aparente de aminoácidos é a determinação de apenas alguns dos resíduos presentes na proteína, então, frequentemente como é o caso no presente trabalho, nem cisteína nem triptofano foram determinados uma vez que cada um desses aminoácidos requer um procedimento analítico diferente. Sem resultados para esses dois aminoácidos se torna difícil avaliar o significado nutricional de análises de proteína porque ambos são aminoácidos essenciais e de fato cisteína é o aminoácido limitante em feijão. Entretanto, a comparação dos resultados apresentados nas Tabelas 4a e 4b com dados relatados em outros estudos de feijão (CURY, 1980; CARVALHO, 1981), sugere que as composições em aminoácidos das amostras examinadas não diferiram substancialmente entre si e nem por comparação com as composições de outras cultivares.

O equipamento de microdiluição e micropipetagem da Cooke Eng. Company permite a avaliação relativamente

rápida e simples das atividades aglutinantes de soluções. A desvantagem do procedimento é que ele emprega a técnica de diluição em série com a consequência de que erros na diluição se tornam acumulativos. Por esta razão muitos pesquisadores que utilizam o equipamento não consideram como significativa a diferença de apenas uma diluição entre os títulos das amostras. Uma outra dificuldade nos estudos de aglutinação provem de diferenças aparentes entre os eritrócitos de diferentes indivíduos de uma mesma espécie, exemplo vaca (JAFFÉ *et alii*, 1974). Esta diferença foi observada neste trabalho durante os testes preliminares e foi solucionada pela utilização de um único indivíduo de cada espécie para todas as preparações. Também foi notado nos estudos preliminares que amostras de sangue humano obtidas de bancos de sangue locais variavam em suas respostas ao mesmo extrato e portanto subsequentemente as amostras de sangue foram tomadas diretamente de um único doador sadio.

Uma significativa variação entre as capacidades aglutinantes de cultivares de feijão foi demonstrada por JAFFÉ e colaboradores (BRUCHER *et alii*, 1969; JAFFÉ *et alii*, 1972 e 1974) e mais recentemente por FELSTED *et alii* (1981) e BROWN *et alii* (1982). Entre esses grupos somente o de Jaffé empregou o equipamento de microtitulação da Cooke Eng. Company e foi o único a usar eritrócitos de mais de duas espécies de ani

mais e, a relatar a ausência de atividade contra eritrócitos de vaca não tratados e também variabilidade entre os eritrócitos tratados obtidos de diferentes indivíduos desta espécie. Os títulos por eles obtidos de seus extratos diferiram de acordo com a espécie de eritrócitos empregado e entre cultivares, de acordo com o tipo de sangue, por exemplo coelho. Esses dois tipos de variação e a ausência de atividade contra sangue de vaca não tratado foram também observados no presente trabalho. Entretanto os títulos foram geralmente menores do que os correspondentes valores tabulados por JAFFÉ (1972,1974). Diversos fatores, isoladamente ou em combinação, poderiam ter causado esta atividade menor, como por exemplo, nossas amostras apresentarem atividades específicas menores ou concentrações em lectina menores ou ainda o uso de suspensões eritrocitárias em concentrações diferentes daquelas usadas (mas não relatadas) por JAFFÉ *et alii*. A última explicação parece ser a mais provável, uma vez que os outros dados obtidos de nossas amostras sugerem que elas não diferem substancialmente de outras coleções de feijão,

Através das variações discutidas acima e da ausência de atividade em algumas cultivares, JAFFÉ *et alii* (1972) foram capazes de distinguir quatro grupos de cultivares de feijão. Cultivares dos grupos A e B tiveram a capacidade de aglu

tinhar eritrócitos humano e de coelho, aquelas dos grupos A e C aglutinaram eritrócitos de vaca tratados e aquelas do grupo D foram inativas contra todos esses tipos de eritrócitos. Dentre as amostras examinadas por BROWN *et alii* (1982), dezesseis cultivares foram as mesmas ou similares àquelas estudadas por JAFFÉ *et alii* (1972). Embora os dados obtidos de somente oito das dezesseis cultivares fossem concordantes, o resultado global obtido por BROWN *et alii*, confirmou a existência dos quatro tipos de cultivares encontrados por JAFFÉ e colaboradores.

Em concordância com BROWN *et alii* (1982), no presente trabalho nenhuma atividade foi detectada para a cv. Pinto, cultivar essa não examinada por JAFFÉ *et alii* (1972, 1974), e então ela foi confirmada como sendo uma cultivar do tipo D. As amostras das cvs. Pintado, Jalo e Goiano precoce se distinguiram das outras amostras pelas suas atividades relativamente altas contra eritrócitos de vaca tratados com tripsina (eritrócitos VTT) e então puderam ser designadas como cultivares tipo A de acordo com o esquema de JAFFÉ; nenhuma das outras amostras examinadas puderam ser consideradas como tipo A, C ou D e é altamente provável que pelo menos as cvs. Bico de ouro, Roxão, Aete-3, Carioca e Carioca precoce sejam tipicamente de tipo B. A cv. Carioca foi também considerada de tipo B no trabalho de BROWN *et alii* (1982). Por ou-

tro lado, os títulos das cvs. Chumbinho opaco, Catu, Iguaçu, Piratã, Porrillo e da linhagem 109-114 de Rosinha contra eritrócitos-VTT foram muito altos para permitir colocá-las no grupo B. Uma vez que nenhuma dessas cultivares, exceto a cv. Porrillo, foram examinadas por JAFFÉ *et alii*, ou por BROWN *et alii*, é possível que elas representem um quinto grupo de cultivares. Entretanto, uma explicação mais provável é dada por JAFFÉ *et alii* (1972) que declaram a observação de amostras contendo sementes pertencentes a dois grupos. Esta possibilidade não foi testada no presente trabalho, entretanto parece relevante o fato de que entre as cinco amostras da cv. Porrillo que BROWN *et alii* examinaram, uma se comportou como tipo B, e as outras quatro, igualmente como a única examinada por JAFFÉ *et alii* (1974), como amostras tipo C.

Em ambas publicações discutidas acima, cultivares de tipo A foram mais abundantes do que as do tipo B e tipos C e D foram mais raras. Tipos C e D não foram encontrados entre as amostras brasileiras e somente três das quinze cultivares foram tipo A. Essa diferença na frequência dos quatro tipos pode ser resultado do pequeno número de amostras examinadas no presente trabalho, entretanto, ela pode alternativamente, indicar uma diferença real na composição global das amostras brasileiras.

FELSTED *et alii* (1981) examinaram as ativida-

des aglutinantes de suas amostras somente contra eritrócitos humano e de coelho tratados com tripsina. Embora eles tenham detectado variação entre as atividades específicas contra eritrócitos de coelho, eles não foram capazes de separar suas amostras por meio da atividade aglutinante. Todas as amostras aglutinaram eritrócitos humanos, com atividades iguais e é evidente portanto, que nenhuma amostra tipo C e D foi incluída naquele trabalho.

O procedimento eletroforético descrito por REISFELD *et alii* (1962) foi um dos primeiros pelo qual proteínas puderam ser separadas sob condições ácidas com alta resolução em géis de poliacrilamida. Ele não tem sido usado frequentemente para a separação de proteínas de sementes possivelmente porque uma grande proporção dessas proteínas precipita, ou tem mobilidade muito baixa sob estas condições. Isto é ilustrado pelos perfis protéicos mostrados nas Figuras 3A e 3B, nas quais uma considerável parte da proteína que entrou nos géis teve somente baixo R_m . Entretanto este procedimento fornece um método rápido pelo qual as cinco isolectinas de feijão podem ser separadas e visualizadas (MILLER *et alii*, 1973). MANEN e MIÈGE (1977) e MANEN (1978) relataram que o perfil isolectínico não é invariável dentro da espécie e esta variação foi também encontrada por CARVALHO (1981) e FELSTED *et alii* (1981). Este último grupo de pesquisadores encontrou pe

lo menos três tipos de perfis isolectínicos entre suas amostras, incluindo dois tipos nos quais foram detectados menos do que cinco isolectinas.

Pelo menos cinco tipos de perfis isolectínicos foram observados no presente trabalho. Esses tipos se diferenciaram pela isolectina mais proeminente em cada um deles, isto é: tipo 1, isolectina 5; tipo 2a, isolectina 4; tipo 2b, isolectinas 4 e 2; tipo 3, isolectina 3; tipo 4, isolectina 2. A distribuição desses tipos de perfis entre as amostras está resumida na Tabela 9, na qual, são também mostrados os tipos de aglutinação das amostras de acordo com o esquema de JAFFÉ *et alii* (1972, 1974). Esta Tabela sugere a existência de uma correlação relativamente boa entre tipo de aglutinação e perfil isolectínico, uma vez que cultivares do grupo A deram perfis isolectínicos tipo 1, a cv. Pinto, representante do grupo D teve perfil isolectínico tipo 4, cultivares do grupo B que pareceram mostrar variações em suas atividades forneceram perfis isolectínicos tipos 2a e 2b e duas das amostras (cv. Porriillo e linhagem Rosinha F79:109-114) que não puderam ser agrupadas em nenhum dos quatro grupos, A, B, C e D, deram perfis isolectínicos tipo 3.

O sistema eletroforético descrito por DAVIS (1964), tem sido frequentemente utilizado para estudos de pro

Tabela 9 - Tipos de perfís isoelectínicos obtidos dos extratos dos cotilédones de feijão e os tipos de atividade aglutinante desses extratos.

C U L T I V A R E S	TIPO ISOLECTÍNICO	GRUPO DE AGLUTINAÇÃO
Bico de Ouro	2a	B
Roxão	2a	B
Aete-3	2a	B
Carioca (1)	2a	B
Carioca (2)	2a	B
Carioca precoce	2b	B
Rico-23	2a ^o	B?
Rosinha G ₂	2b	B?
Venezuela-350	2a	B?
Rosinha F79:1-6	2a	B?
Chumbinho opaco	2a	B?
Catu	2a	n.a.*
Iguaçu	2a	n.a.
Piratã	2a	n.a.
Rosinha F79:109-114	3	n.a.
Porrillo	3	n.a.
Pintado	1	A
Jalo	1	A
Goiano precoce	1	A
Pinto	4	D

n.a. = não agrupada.

teínas de sementes de leguminosas, especialmente para as análises de extratos brutos e para caracterização das duas principais proteínas: legumina e vicilina (BOULTER *et alii*, 1967; JACKSON *et alii*, 1969; DERBYSHIRE e BOULTER, 1976; CURY, 1980; DERBYSHIRE *et alii*, 1981). Quando aplicado em análises comparativas de cultivares de feijão ele tem sempre demonstrado diferenças entre seus perfis protéicos (BARKER *et alii*, 1976; CURY, 1980; CARVALHO, 1981; DERBYSHIRE *et alii*, 1981). Ele também é usado por fabricantes na especificação da qualidade de lectinas comerciais purificadas de feijão, entretanto, ao contrário do sistema de REISFELD *et alii* (1962), ele não resolve as cinco isolectinas.

A principal proteína tipo-vicilina de *Phaseolus vulgaris*, Glicoproteína II (PUSZTAI, 1966), migra nesse sistema como uma banda larga bastante proeminente (BOULTER *et alii*, 1973; BARKER *et alii*, 1976; DERBYSHIRE *et alii*, 1981). Já foi relatado (CARVALHO, 1981; CARVALHO *et alii*, 1982) que existe diferença de mobilidade desta proteína entre a cv. Goiano precoce e outras diversas cultivares, e agora, este trabalho mostra (Figura 4B) que a mobilidade da glicoproteína II nas cvs. Pintado e Jalo são similares àquela obtida para a cv. Goiano precoce. Embora essas três cultivares tenham também diferido das outras em suas composições lectínicas, a existência de uma correlação entre composição lectínica e estrutu

ra da glicoproteína II não é confirmada pelos dados obtidos por BROWN *et alii* (1982).

Legumina isolada de *Phaseolus vulgaris*, apresenta R_m 0,1 (DERBYSHIRE e BOULTER, 1976) ou 0,15 (BARKER *et alii*, 1976) quando examinada no sistema eletroforético de Davis. Proteínas com mobilidades similares a estes valores foram detectadas em todas as amostras examinadas no presente estudo, entretanto a complexidade dos perfis protéicos nesta região dos géis, impede a designação inequívoca de qualquer proteína em particular como sendo legumina.

Uma dificuldade semelhante ocorre com respeito à identificação de lectina. Proteínas com mobilidades iguais aquela de um ou de ambos componentes mais proeminentes de PHA foram detectados em todas as amostras, entretanto, uma vez que as mobilidades dos componentes de PHA não são muito diferentes do que a da legumina, a interpretação dos perfis nesta área do gel não é possível. Apesar disso é interessante, e possivelmente significativa, que os perfis obtidos das cvs. Pintado, Jalo e Goiano precoce tenham sido similares entre si e diferido daqueles obtidos das outras amostras, e que quatro bandas foram resolvidas nesta parte do gel somente nas amostras das cultivares que poderiam ser heterogêneas (pág. 72).

O sistema eletroforético dissociante (SDS) uti-

lizado separou polipeptídeos com pesos moleculares (PMs) menores do que 100.000 e maiores do que 10.000 e isto pode ter contribuído para a pequena variação observada entre os perfis polipeptídicos (cinco tipos) quando comparada com os perfis protéicos obtidos nos outros dois sistemas já discutidos. Desta forma algumas das proteínas podem ter sido compostas de polipeptídios de PMs menores do que 10.000 ou maiores do que 100.000 que não teriam sido resolvidos. Uma outra causa que poderia ter contribuído para a pequena variação seria a formação de diferentes complexos de associação ou dissociação (DERBYSHIRE *et alii*, 1976) entre as proteínas devido a diferenças entre os componentes não protéicos das amostras.

Diversos grupos de pesquisadores (SUN *et alii*, 1974; BARKER *et alii*, 1976; CARVALHO *et alii*, 1982) relataram duas formas de glicoproteína II que diferem em suas composições polipeptídicas e DERBYSHIRE e CARVALHO (não publicado) encontraram que a glicoproteína II que é composta principalmente de polipeptídeos de PM 50.000 tem mobilidade ligeiramente maior, sob condições alcalinas, do que aquela composta principalmente de polipeptídeos menores. A diferença entre os perfis polipeptídicos das três cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce e aquelas das outras cultivares exceto a cv. Pinto, na região correspondente aos polipeptídeos com PMs entre 50.000 e 46.000 pode portanto ser atribuída a diferenças entre as

duas formas de glicoproteína II. O perfil obtido da cv. Pin
to sugere que mais do que duas formas de glicoproteína II po
dem existir.

Polipeptídeos lectínicos de dois tamanhos dife
rentes foram resolvidos por ALLAN e CRUMPTON (1971), OH e
CONARD (1972); PUSZTAI e WATT (1974), MANEN (1978), CARVALHO
(1981) e diferenças em suas quantidades relativas foram encon
tradas entre preparações de feijão com diferentes composições
isoelectínicas (MANEN, 1978; CARVALHO, 1981). No presente tra
balho, bandas de polipeptídeos com PMs aparentes de 32.000 a
30.000 foram observadas em todas as amostras, incluindo aque
la de PHA, entretanto nenhuma diferença entre as bandas pode
ser relacionada com os tipos de perfis isoelectínicos das amos
tras.

Uma vez que os polipeptídeos são produtos ini
ciais da expressão gênica, as diferenças observadas entre os
cinco perfis polipeptídicos, provavelmente, refletem diferen
ças genéticas significantes entre os cinco grupos de culti
vares que forneceram aqueles perfis.

6. CONCLUSÕES

- Proteínas cotiledonares de cultivares brasileiras de feijão diferem em suas atividades aglutinantes. Estas diferenças resultam de variações nas composições isolectínicas das amostras.
- Existem pelo menos duas formas da principal proteína de feijão, glicoproteína II, em cultivares brasileiras e uma terceira pode ocorrer entre cultivares exóticas.
- As cultivares Pintado, Jalo e Goiano precoce representam um grupo distintamente diferente das outras cultivares de feijão crescidas no Brasil.
- Testes de aglutinação e análises eletroforéticas sob condições ácidas poderiam ser métodos

dos relativamente rápidos para comparar um grande número de amostras. Eles seriam de especial importância em programas de melhoramento se eventualmente for mostrado que a composição lectínica tem um significado agrônômico.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALLAN, D. e M.J. CRUMPTON, 1971. Fractionation of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* by polyacrylamide gel eletrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44:1143-1148.
- ALLEN, N.K. e L. BRILLIANTINE, 1969. A survey of hemagglutinin in various seeds. *J. Immunol.*, 102:1245-1298.
- ALLEN, N.K., A. NEUBERGER e N. SHARON, 1973. The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.*, 131:155-162.
- ALTSCHUL, A.M., J.E. SNOWDEW JR., D.D. MANCHON JR. e J.M. DECHARY, 1961. Intracellular distribution of seed proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95:402-404.
- ANDREWS, A.T., 1974. Navy (haricot) bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. *Biochem. J.*, 139:421-429.

AOAC. Associação de Química Analítica Oficial, 1975. 12^a ed.

BAILEY, C.J. e D. BOULTER, 1970. The structure of legumin, a storage protein of broad bean (*Vicia faba*) seed. *European J. Biochemistry*, 17:460-466.

BARKER, R.D.J., E. DERBYSHIRE, A. YARWOOD e D. BOULTER, 1976. Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seeds. *Phytochemistry*, 15:751-757.

BEEVERS, L., 1976. Nitrogen metabolism in plants. Arnold, London, U.K.

BIRD, G.W.G., 1959. Haemagglutinins in seeds. *Brit. Med. Bull.*, 15:165-168.

BOULTER, D., I.M. EVANS e E. DERBYSHIRE, 1973. Proteins of some legumes with reference to environmental factors and nutritional value. *Qualitas Plantarum*, 23:239-250.

BOULTER, D., D.A. THURMAN e E. DERBYSHIRE, 1967. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. *New Phytol.*, 66:27-36.

- BOURRILLON, R., 1973. Interactions des phytohemagglutinines avec les sites récepteurs glucidiques des membranes de surface des cellules normales et transformées. *Expo. Ann. Biochim. Med.*, 32^e Su:59-91.
- BOYD; W.C. e R.M. REGUERA, 1949. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J. Immunolog.*, 62:333-339.
- BOYD, W.C. e E. SHAPLEIGH, 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119:419.
- BROWN, J.W.S., T.C. OSBORN, F.A. BLISS e T.C. HALL, 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.
- BRUCHER, O., M. WECKSLER, A. LEVY, A. PALOZZO e W.G. JAFFÉ, 1969. Comparison of phytohaemagglutinins in wild beans (*Phaseolus aborigineus*) and in common beans (*Phaseolus vulgaris*) and their inheritance. *Phytochemistry*, 8:1739-1743.

- CARVALHO, M.T.V., 1981. Investigações bioquímicas sobre hemaglutininas e outras proteínas de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese de doutoramento.
- CARVALHO, M.T.V., V.L.M. ROMANI e E. DERBYSHIRE, 1982. Uma correlação entre as propriedades de duas proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Resumos do I Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, p.23. Jaboticabal, S.P.
- CHAVES, N., 1952. As proteínas do feijão macassar na nutrição. *Revista Brasil. Med.*, Rio de Janeiro, 9:603-607.
- CLARKE, A.E., R.B. KNOT e M.A. JERMYN, 1975. Localization of lectins in legumes cotyledons. *J. Cell. Sci.*, 19:157-167.
- CNPAF, 1980. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Boletim Informativo.
- CURY, J.A., 1980. Contribuição ao estudo de isoenzimas de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese de Doutoramento em Bioquímica, apresentada ao Departamento de Bioquímica da USP, S.P.
- DAHLGREN, K., J. PORATH e K. LINDAHL-KIESSLING, 1970. On the purification of PHA from *Phaseolus vulgaris* seeds. *Archs. Biochem. Biophys.*, 137:306-314.

- DANIELSON, C.E., 1949. Seed globulins of the gramineae and leguminosae. *Biochem. J.*, 44:387-400.
- DAVIS, B.J., 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:404-427.
- DERBYSHIRE, E. e D. BOULTER, 1976. Isolation of legumin like protein from *Phaseolus aureus* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 15:411-414.
- DERBYSHIRE, E., H.P. MULLER, M.T.V. CARVALHO e O.J. CROCOMO, 1981. Proteins profiles of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*) obtained by electrophoresis in slabs of polyacrylamide gel. *Energia Nuclear e Agricultura*, 3:100-109.
- DERBYSHIRE, E., D.J. WRIGHT e D. BOULTER, 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15:3-24.
- DIECKERT, J.W. e M.C. DIECKERT, 1976. The chemistry and cell biology of the vacuolar proteins of seeds. *J. Food Sci.*, 41:475-482.

- ENSGRABER, A., 1958. Die phytohamagglutinine und ihre funktion in der pflanze ab Kohlenhydrat transport substanzen. *Ber. dt. Bot. Ges.*, 71:349-361.
- ERIKSON, M.C. e M.J. CHRISPPEELS, 1973. Isolation and characterization of glucosamine containing storage glycoproteins from the cotiledons of *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.*, 52:98-104.
- ETZLER, M.E., 1981. Are lectins involved in plant-fungus interactions? *Phytopathology*, 71(7):744-746.
- F.A.O., 1970. F.A.O. Nutritional studies n° 24. Rome.
- FELSTED, R.L., R.D. LEAVITT e N.R. BACHUR, 1975. Purifications of the phytohemagglutin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta*, 405:72-81.
- FELSTED, R.L., J. LI, G. POKRYWRA, M.J. EGORIN, I. SPIEGEL e R.M.K. DALE, 1981. Comparison of *Phaseolus vulgaris* cultivars on the basis of isolectins differences. *Int. J. Biochem.*, 13(5):549-557.
- F.I.B.G.E., 1979. Anuário Estatístico do Brasil, 1978. FIBGE, Rio de Janeiro.

FORIERS, A., C. WUILMART, N. SHARON e A.D. STROSBERG, 1977.

Extensive sequence homologies among lectins from leguminous plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75:980-986.

GALBRAITH, W. e I.J. GOLDSTEIN, 1970. Phytohemagglutinins:

a new class of metalloproteins. Isolation purification and some properties of the lectin from *Phaseolus lunatus*. *FEBS Letters*, 9:197-201.

GATEHOUSE, J.A. e D. BOULTER, 1980. Isolation and properties

of a lectin from the roots of *Pisum sativum* (garden pea). *Physiol. Plant.*, 49:437-442.

GOLDSTEIN, I.J., 1967. Plant derived lectins. Phytochemistry

of cell recognition and cell surface interaction, vol.15:25.

HAGUE, D.R., 1975. Studies of storage proteins of higher

plants I: Con A from three species of the genus *Canavalia*. *Plant Physiol.*, 55:636-642.

HAMBLIM, J. and S.P. KENT, 1973. Possible role of

phytohaemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nature New Biol.*, 245(5):28-30.

HILL, R.L., 1965. Hydrolysis of proteins. *Adv. in Protein Chemistry*, 20:37-107.

HILL, J.E. e R.W. BREIDENBACH, 1974a. Proteins of soybean seeds. I: Isolation and characterization of the major components. *Plant Physiol.*, 53:742-746.

HILL, J.E. e R.W. BREIDENBACH, 1974b. Proteins of soybean seeds. II- Accumulation of the major proteins content during seed development and maturation. *Plant Physiol.*, 53:747-751.

HONOVAR, P.M., 1962. The inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fraction isolated from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutr. Philadelphia*, 77:109-

IOFFE, K.G., A.R. RAKHIMOV, I.A. ASATOV e G. LAMM, 1968. General preparative method of successive extration of proteins and peptides from seeds of leguminous and malvaceus plants. *Biokhimiya*, 33(3):652-657.

ISHINO, K. e D.M.L. ORTEGA, 1975. Fractionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J. of Agric. and Food Chemistry*, 23:529-533.

- ITOH, M., K. KONDO, H. KOMADA, K. IZUTSU, Y. SHIMA BAYASHI e T. TAKAHASHI, 1980. Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* seed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(1):125-133.
- JACKSON, P., D. BOULTER e D.A. THURMAN, 1969. A comparison of some properties of vicilin and legumin. *New Phytologist*, 68:25-33.
- JAFFÉ, W.G., 1960. Uber phytotoxine aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*). *Arzneimittel Forsch, Aulendorf*, 10:1012-1016.
- JAFFÉ, W.G., 1980. Hemagglutinins (lectins), cap.3. Toxic constituents of plant foods. Second edition:73-101.
- JAFFÉ, W.G. e K. GAEDE, 1959. Purification of a toxic phytohemagglutinin from black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Nature*, 183:1329-1330.
- JAFFÉ, W.G. e K. HANNING, 1965. Fractionation of proteins from Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Bioch. and Biophys.*, 109:80-91.
- JAFFÉ, W.G. e C.L.V. LETTE, 1968. Heat-labile growth inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.*, 94(2):203-210.

- JAFFÉ, W.G., O. BRUCHER e A. PALOZZO, 1972. Detection of four types of phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). 2. *Immun. Allerg. Klin. Immunol.*, 142(2):439-447.
- JAFFÉ, W.G., A. LEVY e D.I. GONZALEZ, 1974. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins, 2685-2693.
- JONES, D.B.; C.E.F. GERSDORFF e S. PHILLIPS, 1937/38. Proteins of the black bean of the mayas. *Phaseolus vulgaris*. *J. Biological Chemistry*, 122:745-755.
- JUNQUEIRA, P.C., 1972. Aspectos econômicos da produção e comercialização do feijão. In: Anais do I Simpósio Brasileiro do feijão, 2:571-626.
- KAKADE, M.L. e R.J. EVANS, 1966. Growth inhibition of rats fed navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.*, 90(2):191-198.
- KAPLAN, L., 1956. The cultivated beans of the pre-historic south west. *Ann. Miss. Bot. Garden*, 43:189-251.
- KAUSS, H., 1976. I- Plant lectins (phytohemagglutinins). *Progress in Botany*, 38:58-70.

- KAUSS, H. e C. GLASER, 1974. Carbohydrate-binding proteins from plant cell walls and their possible involvement in extension growth. *FEBS Lett*, 45:304-307.
- KEIL, B. e Z. SORMOVA, 1965. Laboratorium stechnik für biochemiker, leipzig Akademische Verlags Gesellschaft. geestu. Portig.
- KORNFELD, R. e S. KORNFELD, 1970. The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 245:2536-2565.
- KRUPE, M., 1956. Blutgruppen spezifische pflanzliche Eiwuskörper (Phytoagglutinine). Enke, Stuttgart.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227:680-685.
- LANDESTEINER, K. e H. RAUBITSCHHECK, 1908. Biobachtungen über hämolyse und hamagglutination. *Zbe. Bakt.*, 45:660-667.
- LARKIN, P.J., 1978. Plant protoplast agglutination by lectins. *Plant Physiol.*, 61:626-629.
- LEAVITT, R., R. FELSTED e N. BACHUR, 1975. Isolation of five isolectins of phytohemagglutinen from red Kidney beans. *Fed. Proc.*, 34:2020.

- LESENEY, A.M., R. BOURILLON e S. KORNFELD, 1972. The nature of the erythrocyte receptor site for *Robinia pseudoaccacia* phytohemagglutinin. *Archs. Biochem. Biophys.*, 153:831-836.
- LIENER, I.E., 1964. Seed hemagglutinins. *Econ. Bot.*, 18:27-33.
- LIENER, I.E., 1974. Phytohemagglutinins: Their nutritional significance. *J. Agr. Food. Chem.*, 22(1):17-22.
- LIMA, B., 1970. Estudo bromatológico de feijões (*Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna sinensis* Endl.) nas condições em que são vulgarmente consumidos, São Paulo. Faculdade de Ciências farmacêuticas da USP. Tese.
- LOWRY, O.; N. ROSEBROUGH, A. FARR, e R. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- MANEN, J.F., 1978. Comparaison entre les lectines des grains de quelques *Phaseolus*: relations entre le polymorphisme observé la mise en culture et l'hybridation possible entre species. *Condollea*, 33:193-200.
- MANEN, J.F. e M.N. MIEGE, 1977. Purification et characterization des lectins isolées dans les albumines et les globulines de *P. vulgaris*. *Physiol. Veg.*, 15(1):163-173.

- MATSUMOTO, I. e T. OSAWA, 1972. The specific purification of various carbohydrate-binding hemagglutinins. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 46:1810-1815.
- Mc LEESTER, R.C., T.C. HALL, S.M. SUN e F.A. BLISS, 1973. Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. *Phytochemistry*, 2:85-93.
- MEDINA, J.C., 1972. O feijão no Brasil. In: Anais do I Simpósio Brasileiro de feijão. 1º volume:1-106.
- MIALONIER, G., J.P. PRIVATE, M. MONSIGNY, G.M. KAHLEM e R. DURAND, 1973. Isolement propriete physicochimiques et localization in vivo d'une phytohemagglutinine (lectine) de *Phaseolus vulgaris* (var. rouge). *Physiol. Veg.*, 11:519-537.
- MILLER, J.B., R. HSU, R. HEINRIKSON e S. YACHNIN, 1975. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72:1388-1391.
- MILLER, J.B., C. NOYES, R. HEINRIKSON, H.S. KINGDON e S. YACHNIN, 1973. Phytohemagglutinin mitogenic proteins. Structural evidence for a family of isomitogenic proteins. *J. Exp. Med.*, 138:939-951.

- MIRANDA, C.S., 1968. Origem de *Phaseolus vulgaris*. *Agronomia Tropical*, 18(2):191-205.
- MONSIGNY, M., J.C. SAMPAIO FILHO e J.H. DUARTE, 1972. Purification d'une lectine du haricot blanc (*Phaseolus vulgaris*). *Arq. Biol. Technol.*, 15:40-41.
- MOREIRA, R.A. e J.C. PERRONE, 1977. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, 59:783-787.
- NOWELL, P.C., 1960. Phytohaemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, 20:462-466.
- OH, Y.A.; R.A. CONARD, 1972. Further studies on mitogenic components of *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin: subunit structure. *Arch. Bioch. Biophys.*, 152:631-637.
- OSBORNE, T.B., 1894a. The proteins of the Kidney bean. *J. Amer. Chem. Soc.*, 16:633-712.
- OSBORNE, T.B., 1894b. The proteins of Kidney bean. *J. Amer. Chem. Soc.*, 16:757-764.
- OSBORNE, T.B., 1924. The vegetable proteins, Lorgmans green and Co. London.

- OSBORNE, T.B. e G.F. CAMPBELL, 1896. The proteins of lupin seeds. *J. Amer. Chem. Soc.*, 19:454-482.
- PUSZTAI, A., 1966. The isolation of two proteins glicoprotein II and a trypsin inhibitor, from the seeds of Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem. J.*, 101:379-384.
- PUSZTAI, A. e W.B. WATT, 1970. Glicoprotein II. *Biochem. Biophys. Acta.*, 207:413-431.
- PUSZTAI, A.; W.B. WATT, 1974. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*. A comprehensive study of fractionation. *Biochem. Biophys. Acta.*, 365:57-71.
- PUSZTAI, A., R.R.D. CROY, G. GRANT e W.B. WATT, 1977. Compartmentalization in the cotyledonary cells of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. A differential sedimentation study. *New Phytol.*, 79:61-71.
- RACUSEN, D. e M. FOOTE, 1971. The major glycoprotein in germinating bean seeds. *Can J. Bot.*, 49:2107-2111.
- REISFELD, R.A., U.J. LEWIS e D.E. WILLIAMS, 1962. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195:281-283.

- RENKONEN, K.O., 1948. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of family of leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, 26:66-72.
- RIGAS, D.A. e E.E. OSGOOD, 1955. Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, 212:607-615.
- ROSANEN, V., T.H. WEBER e R. GRASBECK, 1973. Crystalline Kidney bean leucoagglutinin. *Bur. J. Biochem.*, 38:193-200.
- ROYER, A., M.N. MIÈGE, A. GRANGE, J. MIÈGE e J.M. MASCHERPS, 1974. Inhibiteurs anti-trypsine et activites protiolytiques des albumines de grains de *Vigna unguiculata*. *Planta*, 119:1-16.
- SALK, J.E., 1944. A simplified procedure for tetrating hemagglutinating capacity of influenzavirus and the corresponding antibody. *J. Immunol.*, 49:87-98.
- SELA, B.A., H. LIS, N. SHARON e L. SACHS, 1973. Isolectins from wax bean with differential agglutination of normal and transformed cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 310:273-277.

- SGARBIERI, V.C.; P.L. ANTUNES e L.D. ALMEIDA, 1979. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Science*, 44:1306-1308.
- SHARON, N.; H. LIS, 1977. Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, 177:949-959.
- SOUZA, N. e J.E. DUTRA DE OLIVEIRA, 1969. Estudo experimental sobre o valor nutritivo de misturas de arroz e feijão. *Rev. Bras. Pesq. Biol.*, 2(3):175-180.
- STILLMARK, H., 1888. Über rizin, ein giftiges ferment aus dem samen von *Ricinus communis* L. und linigen. Euphorbiaceen. Inaug. Diss., DORPAT.
- SUMNER, J.B., 1919. The globulins of the jack bean *Canavalia ensiformis*. *J. Biol. Chem.*, 37:137-141.
- SUMNER, J.B. e S.F. HOWELL, 1936a. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalina A. *J. Bacteriol.*, 32:227-237.
- SUMNER, J.B. e S.F. HOWELL, 1936b. The role of divalent metals in the reversible inactivation of jack bean hemagglutinin. *J. Biol. Chem.*, 115:583-588.

SUN, S.M., R.C. Mc LEESTER, F.A. BLISS e T.C. HALL, 1974.

Dissociation of globulins from *Phaseolus vulgaris* seed.
J. Biological Chemistry, 249:2118-2128.

TAKAHASHI, T.; P. RAMACHANDRAMURTHY; I.E. LIENER, 1967.

Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 133:123-133.

TAYLOR, A.S., 1966. Estudos sobre polen de *Phaseolus*.

Turrialba, 16(1):7-14.

TIGGELMAN-Van KRUGTEN, V.A.H.; C.M. OSTENDORF-DOYER e W.A.

COLLIER, 1956. Über halmagglutinine in pflanzenextracten.
Ant. Leen. J. Micro. Serol., 22:289-303.

TOBISKA, J., 1964. Die. Phytohaemagglutinine. Akademie

Verlag. Berlin.

TOMBS, M.P., 1967. Protein bodies of the soybean. *Plant*

Physiol., 42:797-813.

TOMS, G.C. e WESTERN, 1971. Phytohaemagglutinins.

In: Chemotaxonomy of the leguminosae. Ed. Harborn, J.B.; D. Boulter e B.L. Turner. Academic Press. London, and New York. p.367-462.

- TOYOSHIMA, S., M. FUKUDA e T. OSAWA, 1972. Chemical nature of the receptor site for various phytomitogens. *Biochemistry*, 11:4000-4005.
- TULMANN NETO, A., 1975. Contribuição ao melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando aumentar a quantidade e melhorar a qualidade da proteína. Tese de Doutorado apresentada à ESALQ/USP. Piracicaba, SP.
- VIEIRA, C., 1978. Cultura do feijão.
- WATERMAN, H.C.; C.O. JOHNS e D.B. JONES, 1923. Conphaseolin. *J. Biol. Chem.*, 56:93-104.
- WEBER, T.H., H. CIRO e C.T. NORDMAN, 1972. Characterization of lymphocyte stimulating blood cell-agglutinating glycoproteins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70:729-737.
- YACHNIN, S. e R.H. SVENSON, 1972. The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology*, 22:871-883.
- YEMM, E.W., 1958. In Encyclopedia of plant physiology (Ed. Ruhland, W.). vol. VIII, pp.315-332. Springer-Verlag. Berlin.

ZUCOLOTO, F.S. e C.R.D. CORDEIRO, 1971. Valor nutritivo de algumas variedades de feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) consumidos em Ribeirão Preto. Cienc. Cult. São Paulo, 23:340-341.