



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ GABRIEL DA SILVA GOMES

PROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXTRATO DE *Phaseolus vulgaris* L.

FORTALEZA

2021

JOSÉ GABRIEL DA SILVA GOMES

PROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXTRATO DE *Phaseolus vulgaris* L.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G614p Gomes, José Gabriel da Silva.
Prospecção e identificação de proteínas do extrato de *Phaseolus vulgaris* L. / José Gabriel da Silva Gomes.
– 2021.
48 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

1. Feijão carioca. 2. Atividade de L-asparaginase. 3. Identificação de proteínas. 4. Espectrometria de
massas. I. Título.

CDD 570

JOSÉ GABRIEL DA SILVA GOMES

PROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXTRATO DE *Phaseolus vulgaris* L.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

Aprovada em: 02/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Celeneide e Alves por sempre me apoiarem a estudar e proverem meu sustento e as condições necessárias para que eu pudesse chegar até aqui, além de acreditarem na ciência e me motivarem a ser um cientista que sempre tenta fazer seu melhor e correr atrás dos sonhos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por todos os ensinamentos ao longo desses anos em que fui iniciante científico no Laboratório de Biocristalografia (LABIC). Em especial, agradeço enormemente à Cássia e à Jucilene pela amizade valiosa, pelas risadas, ensinamentos e serem, praticamente, minhas duas mães científicas.

Agradeço ao professor Bruno Anderson por ter me dado a oportunidade de integrar a equipe do LABIC mesmo quando não fui o selecionado durante a seleção de bolsista em 2018. Agradeço pelos ensinamentos e direcionamentos, os quais foram muito necessários para que eu continuasse aprendendo. Agradeço também por ser paciente e lidar com minha ansiedade e minhas perturbações.

Agradeço muito ao professor Rômulo Farias Carneiro por aceitar fazer parte da banca, ter me ajudado com uma grande parte deste trabalho e pela paciência e espaço no Laboratório de Química de Proteínas. Agradeço também a todos os integrantes do laboratório pelas dúvidas tiradas e fornecimento de materiais quando precisei.

Agradeço ao Eduardo por todos os ensinamentos, risadas. Desculpa pela luva com beta na sua cara haha! Agradeço por ter aceitado fazer parte da minha banca e por ser esse “foda e humildão”.

Agradeço demais aos meus amigos de graduação Daniel, Sara, Will, Ramon, Lucas, Yuri, Isabel, Marcos, Mariana, Bruna (Friend), Yvana, Mayra, Bruna Nunes, Davi, Emerson pelos momentos e pela amizade. Sem vocês, a graduação seria insuportável. Gente, pelo amor, se eu esqueci alguém, me perdoem!

Agradeço aos meus amigos Keissy, Ronny e Laís pela amizade maravilhosa e pelos momentos compartilhados comigo há anos. Tudo isso me ajuda e ajudou a tentar levar minha vida com maior leveza.

Agradeço às amigas que a arte me deu, Keyliane e Karen, pelas grandes risadas e momentos que tivemos juntos. Nossa arte e amizade me proporcionam momentos de relaxamento e esquecimento do mundo acadêmico. Espero conseguir fazer o mesmo por vocês.

Agradeço a Deus que, por mais que nossa relação não seja das melhores, se faz presente em minha vida através da fé e oração das pessoas que me rodeiam.

Agradeço a minha psicóloga Vlória pelas nossas sessões de terapia que foram o alívio para tanta ansiedade que tive nesses últimos momentos de graduação. Sem você, não sei como as coisas teriam prosseguido. Muito obrigado.

Por fim, agradeço à Arte e todas as reflexões que me proporciona. Todos os alívios e extravasamentos pelos dedos e pela voz. Parte essencial da minha vida. Espero que nossos momentos juntos voltem a ser tão maravilhosos quanto costumavam ser há alguns meses. Por fim, deixo um poema sem muita pretensão, apenas para expressar meu interior nesse momento final de graduação:

Passeio pelo mundo inteiro, mas

Sempre estive aqui.

Das profundezas do oceano,

Ao topo da mais alta montanha,

Já visitei.

Talvez não com meus próprios pés, porém

Através dos olhos e corpos de outros seres.

Fora de mim, eu já estive em você.

Os muitos processos,

Aqueles que o cérebro se recusa a contar,

Eu já tentei entender.

Todos esses passos mundiais,

Em tempo geológico, me fizeram compreender:

As flores desabrocham nas sombras.

Somos nós que as apresentamos ao mundo,

Pois elas são as estrelas. Somos apenas fãs.

RESUMO

Proteínas são biomoléculas de extrema importância para sistemas biológicos. O estudo das mesmas leva a um melhor entendimento sobre como a vida e suas variadas formas funcionam de forma tão elaborada. Essas pesquisas também abrem espaço para a aplicação dessas proteínas em atividades exercidas pela humanidade. A Ciência já teve grandes sucessos em aplicar biotecnologicamente proteínas, como a insulina e a DNA-polimerase. Diversas fontes para essas proteínas podem ser citadas, e as plantas estão entre elas. Proteínas vegetais foram e ainda são muito estudadas e possuem potenciais biotecnológicos inexplorados. Nesse contexto, as leguminosas são uma família vegetal de extensa distribuição, abundância e diversidade que possui a característica de armazenar altos teores proteicos em suas sementes. Pensando nisso, o intuito deste trabalho foi extrair e identificar proteínas/enzimas de sementes maduras de Feijão Carioca, *Phaseolus vulgaris*, com potencial biotecnológico. Para isso, sementes obtidas comercialmente foram trituradas e submetidas à solubilizadas para extrair as proteínas da testa e cotilédones. O extrato bruto foi dialisado e aplicado numa coluna de troca aniônica DEAE-Sephacel para cromatografia. Três picos foram eluídos com aumentos crescentes na concentração de KCl. SDS-PAGE 12 % foi realizado com as frações e o extrato para analisar o perfil proteico e excisar as bandas presentes no gel. As bandas excisadas foram reduzidas e alquiladas para que seus peptídeos pudessem ser extraídos. Espectrometria de massas foi o método utilizado para sequenciar os peptídeos extraídos e as proteínas foram identificadas com auxílio do programa MASCOT, utilizando a base de dados Swissprot. Além disso, o extrato de 7 marcas de feijão carioca foi testado quanto à atividade de L-asparaginase. 8 bandas foram puderam ser excisadas para identificação, resultando em 4 proteínas identificadas e suas subunidades: Lipoxigenase, Faseolina, Fitoalgotinina e Inibidor de α -amilase. Dentre os feijões testados, apenas uma marca apresentou mínima atividade de L-asparaginase, mesmo quando as condições dos ensaios foram maximizadas. Conclui-se que foi possível identificar 4 proteínas das sementes de feijão carioca, cada uma com seu potencial biotecnológico que ainda pode ser explorado. Além disso, a atividade de asparaginase nula ainda nos retorna aprendizado e ideias para possíveis estratégias para purificá-la e melhor caracterizá-la.

Palavras-chave: Feijão carioca; Atividade de L-asparaginase; Identificação de proteínas; Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Proteins are extremely important biomolecules for biological systems. Studying them leads to a better understanding of how life and its various forms work in such an elaborate way. These researches also open space for the application of these proteins in activities carried out by humanity. Science has already had great success in applying proteins biotechnologically, such as insulin and DNA polymerase. Several sources for these proteins can be cited, and plants are among them. Plant proteins have been and still are studied extensively and have unexplored biotechnological potential. In this context, legumes are a plant family of extensive distribution, abundance and diversity that has the characteristic of storing high protein content in its seeds. With that in mind, the aim of this study was to extract and identify proteins/enzymes from mature seeds of Carioca Beans, *Phaseolus vulgaris*, with biotechnological potential. For this purpose, seeds obtained commercially were crushed and subjected to solubilization to extract proteins from the testa and cotyledons. The crude extract was dialyzed and applied to a DEAE-Sephacel anion exchange column for chromatography. Three peaks were eluted with increasing KCl concentration. 12% SDS-PAGE was performed with the fractions and extract to analyze the protein profile and excise the bands present in the gel. The excised bands were reduced and alkylated so that their peptides could be extracted. Mass spectrometry was the method used to sequence the extracted peptides and the proteins were identified using the MASCOT program, using the Swissprot database. In addition, the extracts from 7 brands of Carioca beans were tested for L-asparaginase activity. 8 bands could be excised for identification, resulting in 4 identified proteins and their subunits: Lipxygenase, Phaseolin, Phytoagglutinin and α -Amylase Inhibitor. Among the tested beans, only one brand showed minimal L-asparaginase activity, even when the test conditions were maximized. It is concluded that it was possible to identify 4 proteins from Carioca bean seeds, each one with its biotechnological potential that can still be explored. In addition, the null asparaginase activity still gives us learning and ideas for possible strategies to purify it and better characterize it.

Keywords: Carioca beans; L-asparaginase activity; Protein identification; Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da mioglobina de cachalote	12
Figura 2 – Legumes de soja	13
Figura 3 – Plantação de Feijão Carioca, cultivar BRS 10408	16
Figura 4 – Sementes de Feijão Carioca, cultivar BRS 10408	17
Figura 5 – Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca aniônica DEAE-Sephacel	25
Figura 6 – Perfil eletroforético do extrato e frações de feijão carioca da marca Pinheiro em SDS-PAGE 12 %	27
Figura 7 - Estrutura de L-asparaginase de <i>Phaseolus vulgaris</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração proteica dos extratos de feijão carioca de diferentes marcas	24
Tabela 2 – Concentração proteica de extrato e frações obtidas em cromatografia DEAE- -Sephacel	26
Tabela 3 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 1.....	28
Tabela 4 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 2	29
Tabela 5 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 3	30
Tabela 6 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 4	31
Tabela 7 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 5	32
Tabela 8 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 6	32
Tabela 9 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 7	32
Tabela 10 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 8	33
Tabela 11 – Concentração proteica e atividade de L-asparaginase da marca Fibra 2017	35
Tabela 12 – Comparação dos resultados do teste de atividade asparaginásica com extratos de diferentes marcas de feijão carioca	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Sementes de Fabaceae e sua estocagem proteica	12
1.2 Proteínas das sementes de leguminosas	14
1.3 Aplicações biotecnológicas de algumas proteínas de Fabaceae.....	14
1.4 <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Extração e purificação de proteínas.....	20
3.2 Dosagem de proteínas totais solúveis	20
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	21
3.4 Detecção da atividade enzimática de L-asparaginase	22
3.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massas	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Extração e purificação de proteínas.....	24
4.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massas	26
4.3 Detecção da atividade enzimática de L-asparaginase	34
5 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

Proteínas são biomoléculas de extrema importância para os seres vivos por suas diversificadas estruturas, tamanhos e, principalmente, pelas funções que desempenham nos sistemas biológicos. O estudo dessas moléculas e suas funções em diferentes seres vivos permitiu um maior entendimento sobre a vida no planeta, além de criar perspectivas sobre possíveis utilidades que essas proteínas poderiam exercer fora dos seus contextos naturais (LAKSANALAMAI; ROBB, 2004; MACHER; YEN, 2007; OWUSU-ANSAH; MC CURDY, 1991; SHEA; BROOKS, 2001).

De fato, com o avanço dos estudos, várias proteínas se apresentaram como fortes candidatas a serem aplicadas nas mais variadas atividades exercidas pela humanidade, seja de cunho ambiental, seja na saúde humana ou nos diversos tipos de indústrias. Hoje, temos diversos exemplos de estudos bem-sucedidos que conseguiram aplicar proteínas providas de diferentes fontes nas áreas já citadas (KHODAEI; CARLOS; MULLEN, 2021; MATHIEU; MARTENS; VANGOITSENHOVEN, 2021; NAING; KIM, 2019; MAŁECKI; MUSZYŃSKI; SOŁOWIEJ, 2021).

Algumas técnicas e tecnologias desenvolvidas a partir dos estudos com proteínas foram revolucionárias para a sociedade humana em diversos âmbitos. Cristalização de proteínas e a resolução de suas estruturas por difração de raios X impulsionou enormemente nosso entendimento sobre essas biomoléculas, suas funções e mecanismos de ação. Hemoglobinas e mioglobinas foram as primeiras estruturas de proteínas a serem resolvidas (DICKERSON; KENDREW; STRANDBERG, 1961). A figura 1 apresenta uma estrutura de mioglobina de cachalote resolvida.

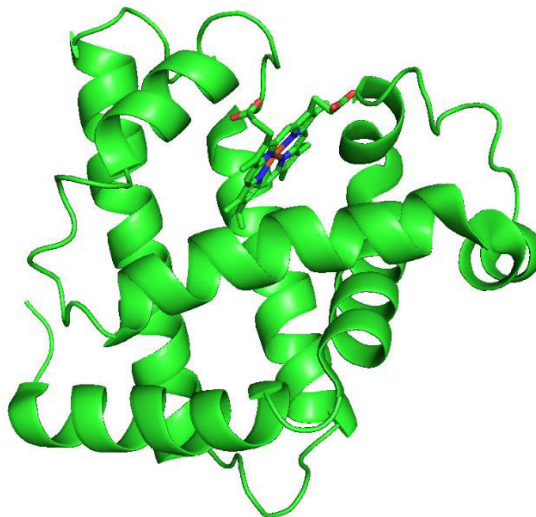
Exemplos de descobertas que revolucionaram o fazer da ciência e até contribuíram para o bem-estar e saúde humana foram a caracterização e utilização em técnicas de biologia molecular de DNA-Polimerase de *Thermus aquaticus*, além da expressão e extração de insulina em microrganismos, como *Escherichia coli*, para a utilização em tratamento de diabetes (EOM; WANG; STEITZ, 1996; MATHIEU; MARTENS; VANGOITSENHOVEN, 2021).

Dentre as diferentes fontes, as plantas têm conquistado seu lugar como promissoras fornecedoras de novas proteínas com grande potencial de bioprospecção. Proteínas vegetais já são estudadas e utilizadas pela humanidade, apresentando potencial antiviral (MUSIDLAK; NAWROT; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, 2017; WANG *et al.*, 2021), antimicrobiano (SILVA *et*

al., 2014; WANG *et al.*, 2021), emulsificadores e encapsulares (MOTA DA SILVA; SOUZA ALMEIDA; KAWAZOE SATO, 2021; SHARIF *et al.*, 2018), entre outras potencialidades.

Nesse quesito, as leguminosas são plantas que têm certo destaque quanto ao estudo e uso de suas proteínas. Sendo uma família botânica diversa e numerosa, com mais de 19.000 espécies, divididas em 3 subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae) (LEWIS *et al.*, 2005), o clado tem grande potencial para ser uma das maiores fontes vegetais de proteínas com importância biotecnológica, especialmente por uma característica presente na grande maioria das espécies pertencentes a esse táxon: a grande quantidade de proteínas estocada em suas sementes. Nesse contexto, foquemos um pouco mais nessa família, a grande reserva proteica de suas sementes e suas potencialidades biotecnológicas.

Figura 1 – Estrutura de mioglobina de cachalote



Fonte: PDB (1MBN) (DICKERSON; KENDREW; STRANDBERG, 1961).

1.1 Sementes de Fabaceae e sua estocagem proteica

Diversa e socioeconomicamente importante como é, a família botânica Fabaceae habita e é cultivada em várias regiões do planeta, desde que sejam propiciadas condições para seu crescimento e reprodução. A reprodução de algumas espécies de leguminosas é muito importante para a nutrição mundial, pois, aliadas aos grãos de gramíneas, suas sementes constituem a dieta de grande parte da população mundial e seu consumo é recomendado por instituições (figura 2) (AH *et al.*, 2006; AY, 2013; JI *et al.*, 2004).

A característica que mais se sobressai e atrai a atenção para o consumo dessas sementes é justamente o alto teor proteico. Proteínas são a principal reserva das sementes de leguminosas,

diferente das gramíneas, as quais armazenam mais açúcares. Essa grande quantidade de proteínas armazenadas em seus cotilédones é o que dá às leguminosas seu alto valor nutricional, apesar de haver discussões sobre essa afirmação (BECERRA-TOMÁS; PAPANDREOU; SALAS-SALVADÓ, 2019).

Figura 2 – Legumes de soja



Fonte: Embrapa (LÁSARO, 2017). Vagens de soja do cultivar BRS 413RR.

A maior parte da reserva das sementes de Fabaceae é armazenada nos cotilédones, uma vez que essa família possui endosperma reduzido e, em algumas espécies, inexistente. As proteínas são armazenadas em células especializadas, no tecido chamado de parênquima de reserva. Nesse tipo de tecido, as proteínas são armazenadas em vesículas especializadas e corpos proteicos localizados no retículo endoplasmático rugoso, onde são traduzidas. Algumas das proteínas são expressas como precursores polipeptídicos, os quais possuem sequências sinais endereçando-os para as vesículas especializadas e são transportados através do complexo de Golgi (HERMAN; LARKINS, 1999).

Entretanto, não são apenas fatores genéticos que regulam a expressão e quantidade de proteínas de reserva nas sementes. Diversos fatores contribuem para que haja variações inter e intraespecíficas. A planta-mãe, a disponibilidade de hormônios e o ambiente são agentes que podem afetar a reserva proteica, até mesmo pela diminuição ou aumento da quantidade de células dos cotilédones. Entre alguns fatores mais específicos, pode-se citar o hormônio ácido

abscísico e a disponibilidade de nitrogênio e outros nutrientes para a planta-mãe e, conseqüentemente, para a semente (GALLARDO; THOMPSON; BURSTIN, 2008; MUNIER-JOLAIN; LARMURE; SALON, 2008).

1.2 Proteínas das sementes de leguminosas

Leguminosas, como dito anteriormente, armazenam grandes quantidades de proteínas em suas sementes. A porcentagem, normalmente, varia entre 18 e 30 % das reservas presentes nos cotilédones. Espécies como *Glycine max* (soja), *Pisum sativum* (ervilha) e *Vicia faba*, por exemplo, possuem trabalhos na literatura que identificam as proteínas de suas sementes por diferentes métodos, sejam eles genômicos, transcricionais e por eletroforese bidimensional aliada à espectrometria de massas (CABELLO-HURTADO *et al.*, 2016; KRISHNAN; OEHRLE; NATARAJAN, 2009; SMOLIKOVA *et al.*, 2020; WARSAME *et al.*, 2020; WARSAME; O’SULLIVAN; TOSI, 2018).

A partir desses estudos, foi possível identificar as proteínas mais abundantes nas sementes, como as vicilinas e leguminas, as fitohemaglutininas e os inibidores de alfa-amilase. A grande concentração dessas proteínas dificulta, inclusive, a identificação de proteínas menos expressas quando são feitos géis de eletroforese bidimensionais. Apesar disso, estudos ainda conseguiram reconhecer várias outras proteínas nas sementes de leguminosas associadas a diferentes processos (SMOLIKOVA *et al.*, 2020).

A identificação dessas proteínas, além de aumentar o conhecimento científico sobre a fisiologia e componentes das reservas de leguminosas, apresentou um viés mais biotecnológico para essas proteínas. Uma vez que Fabaceae são cultivadas com relativa facilidade e rendem grandes quantidades de proteína, são uma ótima fonte de alvos para aplicação biotecnológica. Pensando no assunto, vejamos um pouco mais sobre proteínas de leguminosas e suas aplicações biotecnológicas.

1.3 Aplicações biotecnológicas de algumas proteínas de Fabaceae

Iniciemos pelas lectinas de leguminosas, as quais apresentam várias possíveis aplicações biotecnológicas graças às suas capacidades de se ligarem reversivelmente aos mais variados tipos de carboidratos. A especificidade de ligação a carboidratos das lectinas varia entre as espécies, o que aumenta a gama de possibilidades de aplicação para elas. Algumas espécies apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus (BENKO-ISEPPON; CROVELLA, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2021).

Outra atividade de lectinas de leguminosas que possui um ótimo potencial biotecnológico é a atividade inseticida. Após a ingestão, a interação dessas lectinas com glicoconjugados pode interferir em processos fisiológicos dos insetos e causar distúrbios que afastam ou matam os animais. Para que esse efeito seja alcançado, a lectina em questão precisa ser altamente resistente à proteólise. Algumas lectinas de Fabaceae já apresentaram essa capacidade (MACEDO *et al.*, 2007; MELANDER *et al.*, 2003).

Mais um excelente potencial biotecnológico das lectinas de leguminosas está na atividade antitumoral que algumas espécies apresentam. A interferência no ciclo celular desregulado de células cancerígenas é um efeito dessas proteínas. Uma vez que esse tipo celular apresenta padrão de glicosilação diferente de células saudáveis, diferentes lectinas com diferentes especificidades podem ser utilizadas para tentar conter o avanço da proliferação e propagação do câncer (LL *et al.*, 2011; QL *et al.*, 2015; STAUDER; KREUSER, 2002).

As proteínas presentes nas leguminosas também podem ser amplamente utilizadas na indústria alimentícia. Essas biomoléculas podem atuar como emulsificadores, estabilizantes e encapsulantes que auxiliam como carreadores de outras moléculas bioativas, além das suas atividades antioxidantes e antitrombóticas. Há relatos de utilização, inclusive, na produção de leite animal, melhorando as características físico-químicas e sensoriais (AIDER; BARBANA, 2011; AKIN; OZCAN, 2017; MAŁECKI; MUSZYŃSKI; SOŁOWIEJ, 2021; MOTA DA SILVA; SOUZA ALMEIDA; KAWAZOE SATO, 2021; SHARIF *et al.*, 2018; TANG, 2019).

As proteínas de reserva de leguminosas, como vicilina, legumina e faseolina, também possuem atividades e utilidades estudadas, por mais que suas funções principais sejam armazenamento. A legumina de lentilha, graças as suas características estruturais e físico-químicas, possui a capacidade de estabilizar a formação de espumas. Além disso, faseolina já foi utilizada como constituinte na produção de biofilmes potencialmente capazes de substituir embalagens plásticas de alimentos (GIOSAFATTO *et al.*, 2014; GIOSAFATTO; MARINIELLO; RING, 2007; JARPA-PARRA *et al.*, 2015).

O inibidor de alfa-amilase, por sua vez, é uma glicoproteína de defesa da planta que inibe a atividade de alfa-amilases animais. Por possuir essa atividade inibitória e não afetar as amilases vegetais, plantas transgênicas que expressem essa proteína podem se defender melhor de predadores herbívoros em geral, mas em especial insetos (KLUH *et al.*, 2005). Além disso, sua administração em humanos pode auxiliar no tratamento de síndromes metabólicas, uma vez

que já apresentou resultados satisfatórios em ratos induzidos a terem esse distúrbio (MICHELI *et al.*, 2019).

Ainda em estudos preliminares, a L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* cv. Giza 6 já foi purificada e caracterizada a partir das sementes maduras da espécie. A enzima catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina, formando L-aspartato e amônia. A enzima de feijão comum se demonstrou dependente do íon potássio (K^+) e com baixa atividade contra L-glutamina. Além disso, é estruturada como um dímero de heterodímeros (AJEWOLE *et al.*, 2018; BEJGER *et al.*, 2014; MOHAMED *et al.*, 2015).

L-asparaginases são enzimas que podem ser utilizadas na área da saúde e na indústria alimentícia. Nesta última, seu uso se deve pela capacidade de reduzir a quantidade de acrilamida formada pela redução de açúcares quando alguns alimentos são superaquecidos. A L-asparaginase de *Aspergillus sp.*, um fungo, é utilizada para esse fim (CLAUS; CARLE; SCHIEBER, 2008). Já na área da saúde, visto que algumas células cancerígenas, como aquelas de Leucemia Linfóide Aguda (LLA), dependem de L-asparagina do meio, a L-asparaginase é usada como auxiliar no tratamento quimioterápico de alguns tipos de câncer. Nesse contexto, as enzimas de *Escherichia coli* e *Erwinia sp.* já são bem caracterizadas e comercializadas para esse fim (BATOOL *et al.*, 2016; CECCONELLO *et al.*, 2020; SALZER; SEIBEL; SMITH, 2012).

Foquemos agora numa das plantas mais cultivadas do mundo e que, apesar dos vários estudos realizados com suas diversas variedades, ainda há muito a oferecer, em termos bioquímicos, para a ciência e a sociedade.

1.4 *Phaseolus vulgaris* L.

O feijão comum é uma planta pertencente à família das leguminosas, Fabaceae, mais especificamente da subfamília Papilionoideae, uma das mais numerosas e a que contém a maior variedade de espécies com atual importância socioeconômica. Originário da América Central (BITOCCHI *et al.*, 2012), o feijão comum se tornou uma espécie cultivada mundialmente, sendo o Brasil um dos maiores produtores e com uma grande diversidade de variedades dessa leguminosa (BARILI *et al.*, 2015).

A planta é caracterizada por ser anual e possuir o hábito herbáceo. Como muitas leguminosas, *P. vulgaris* possui folhas alternas compostas, porém trifolioladas. Suas inflorescências são axilares com cores que podem variar entre branco, amarelo, lilás ou rosa e

um pouco maiores que os folíolos de formato ovado (figura 3) (FORZZA *et al.*, 2015; GRAHAM; RANALLI, 1997).

Figura 3 – Plantação de Feijão Carioca, cultivar BRS 10408



Fonte: Embrapa (ARAÚJO, 2015). Plantação de Feijão Carioca (*P. vulgaris* L.), cultivar BRS 10408.

As sementes dessa espécie são conhecidas pelo alto valor nutritivo, as quais, aliadas ao consumo de cereais, suprem necessidades da dieta humana (figura 4). O alto valor proteico das sementes de feijão, além dos carboidratos e lipídeos, todos muito presentes no cotilédone, torna a espécie um alimento de baixo custo, dessa forma sendo capaz de substituir, inclusive, outras fontes proteicas. Esse valor nutricional é o que faz o feijão um alimento essencial e muito presente na prato dos brasileiros e de outros países emergentes (CORTE *et al.*, 2003; LEMOS *et al.*, 2004; REZENDE *et al.*, 2018).

Entretanto esse alto valor nutricional vem acompanhado de fatores antinutricionais que dificultam a digestão desse alimento. Feijão é conhecido por causar indigestão e flatulência em algumas ocasiões, fato ocasionado justamente pela presença de moléculas nas sementes que inibem a ação de proteases, diminuem a absorção de carboidratos e que se ligam a alguns minerais, como cálcio e magnésio (WORKU; SAHU, 2017).

Phaseolus vulgaris é uma espécie cultivada no mundo inteiro e, por diversos fatores, apresenta grande diversidade de variedades do táxon. O Brasil cultiva ao menos 7 variedades de feijão comum com características selecionadas artificialmente (REZENDE *et al.*, 2018). Pensando nessa diversidade, além dos mais variados estudos com proteínas de leguminosas, o feijão comum poderia ser uma fonte valiosa de proteínas e, mais especificamente, enzimas com

alto potencial biotecnológico. Além disso, a facilidade e custo de obtenção são convidativos para a realização da pesquisa, de forma que não haveria dificuldades caso uma reposição de estoque se demonstrasse necessária. Ademais, seria viável cultivar alguns espécimes caso essa estratégia se provasse a melhor opção. Nesse contexto, o intuito desse trabalho foi extrair e identificar as proteínas e enzimas de sementes maduras de Feijão Carioca, *Phaseolus vulgaris* L..

Figura 4 – Sementes de Feijão Carioca, cultivar BRS 10408



Fonte: Embrapa (ARAÚJO, 2015). Sementes de Feijão Carioca (*P. vulgaris* L.), cultivar BRS 10408. Note as marcas marrons características.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Extrair e identificar proteínas do extrato de sementes maduras de *Phaseolus vulgaris* L.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair as proteínas da farinha das sementes de *P. vulgaris*;
- Identificar as proteínas das frações por espectrometria de massas;
- Testar a atividade enzimática de L-asparaginase do extrato e frações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração e purificação de proteínas

Para extrair e purificar as proteínas, obteve-se sementes de *Phaseolus vulgaris* L. de diferentes fornecedores comercialmente. Os feijões testados pertenciam às seguintes marcas: Fibra (2017 e 2021), Pinheiro, Karajá, Dona Dê, Feijão da Casa e a Granel. Apenas as marcas Fibra e Pinheiro foram utilizadas para além do processo de extração proteica. Entretanto, os extratos de todas as marcas citadas foram testados quanto à atividade de L-asparaginase.

As sementes foram, então, trituradas com o auxílio de um moedor de café para formar uma farinha, a qual foi peneirada. A extração proteica consistiu em solubilizar 1 g de farinha em 10 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8, adicionado de KCl 50 mM, Glicerol 10 % e β -mercaptoetanol 12,5 mM, numa proporção 1:10 (m/v). A solução permaneceu sob agitação constante por 2 h à temperatura ambiente. Após esse período, o extrato foi centrifugado por 30 minutos à 10000 xg, 4° C. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante foi filtrado com papel filtro. Em seguida, o extrato foi dialisado numa membrana de diálise com poros de 10 kDa contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8, realizando-se trocas a cada 1 h, totalizando 8 trocas. Por fim, a solução proteica dialisada foi denominada extrato bruto.

Este, por sua vez, foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em matriz cromatográfica DEAE-Sephacel (5 mL). A coluna foi previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 3 mL.min⁻¹, coletando-se 3 mL por fração. A fração não retida na coluna foi eluída com o mesmo tampão utilizado no equilíbrio. Para eluir as proteínas retidas na coluna, utilizou-se um gradiente salino de cloreto de potássio (KCl), adicionado ao tampão já utilizado, nas concentrações 100 e 200 mM. As frações foram acompanhadas a partir de leituras no espectrofotômetro a 280 nm. O extrato e os picos obtidos com a cromatografia foram guardados para as próximas análises.

Quando necessário, as amostras foram concentradas com o auxílio de um concentrador (VivaSpin 20 – Sartorius), sendo submetido à centrifugação a 3500 xg, 4° C, por 30 minutos sucessivas vezes.

3.2 Dosagem de proteínas totais solúveis

A concentração proteica total das amostras foi estimada através do método de Bradford (BRADFORD, 1977). A curva-padrão foi construída a partir de concentrações conhecidas de Albumina Sérica Bovina (BSA) e os resultados foram expressos em mg.mL⁻¹.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para verificar a pureza das amostras, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 12 % de acrilamida, de acordo com o método de Laemmli (1970). O experimento foi conduzido em condições redutoras, nas quais as amostras são preparadas com a presença de β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 minutos. Os experimentos foram feitos sob corrente elétrica de 200 V, com tensão de 60 mA e potência de 6 W.

Após o término da corrida, as proteínas no gel foram reveladas com nitrato de prata. Primeiramente, o gel foi embebido em metanol 40 % por 30 minutos sob agitação constante para que houvesse a fixação das proteínas. Logo após, feito o descarte da solução anterior, o gel foi sensibilizado com uma solução de Tiosulfato de sódio 1,26 mM por 1 minuto sob agitação. O gel foi, então, lavado com água destilada por 20 segundos por 3 vezes. A impregnação com nitrato de prata (AgNO_3) foi realizada imergindo o gel em solução de 11,8 mM de AgNO_3 e 0,074 % de formaldeído por 20 minutos sob agitação e abrigo de luz. Após esse período, o gel foi novamente lavado com água destilada por 20 segundos por 3 vezes. Para que houvesse a revelação das bandas presentes no gel, o mesmo foi imerso em solução de 0,37 M de carbonato de cálcio, 25,2 μM de tiosulfato de sódio e formaldeído 0,05 %. A reação foi bloqueada assim que as bandas se tornaram visíveis com uma solução de metanol 40 % e ácido acético 10%.

Quando necessário, o gel foi corado com Cromassie Brilliant Blue R-250 0,1 %. Nessas condições, o gel permaneceu em contato com o corante em agitação por 15 minutos. Após esse período, o corante foi retirado e o gel foi lavado com água quente sucessivas vezes para que o excesso pudesse ser retirado.

O perfil proteico foi comparado com um marcador molecular comercial da Sigma-Aldrich de amplo espectro, o qual apresenta o seguinte padrão: Miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), Fosforilase B (97 kDa), Albumina (66 kDa), Desidrogenase glutâmica (55 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (36 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), α -lactalbumina (14,2 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa).

3.4 Detecção da atividade enzimática de L-asparaginase

Para o ensaio de atividade enzimática, montou-se uma curva-padrão de sulfato de amônio, compreendendo de 0,05 a 0,95 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. Uma solução estoque de 6 mM de sulfato de amônio foi preparada e, a partir dela, fez-se diluições para obter-se as concentrações desejadas para a curva. O experimento foi realizado em duplicatas. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 μL de solução de sulfato de amônio, 100 μL de reagente de Nessler (K_2HgI_4) (Neon) e 800 μL de água destilada. As soluções foram agitadas com auxílio de um vórtex e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, lidas no espectrofotômetro à 425 nm. Por fim, os dados obtidos foram plotados em um gráfico e uma equação da reta foi gerada para ser utilizada no ensaio de atividade enzimática.

Para testar a atividade catalítica da L-asparaginase, 100 μL de amostra foram incubados com a adição de 900 μL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, adicionado de KCl 50 mM e L-asparagina 20 mM, por 30 minutos à 37° C. O experimento foi realizado em duplicata, além de um controle para cada amostra, no qual não há adição da mesma para o período de incubação. Em seguida, a reação foi parada com a adição de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 15 %. Além do TCA, foram adicionados 100 μL da amostra correspondente em cada grupo controle. A solução foi, então, centrifugada por 5 minutos a 10000 xg, 4° C. Após a centrifugação, 100 μL do sobrenadante foram misturados com 100 μL de reagente de Nessler e 800 μL de água destilada. Esta solução foi agitada com o auxílio do vórtex e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, as soluções foram submetidas à leitura no espectrofotômetro à 425 nm e a concentração de NH_3 foi determinada a partir da curva-padrão de sulfato de amônio. Para determinar a atividade enzimática em $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{[\text{NH}_3] * \text{Volume final da reação (mL)}}{\text{Volume de sobrenadante usado (mL)} * \text{Tempo de reação (min.)} * \text{Q. de amostra (mL)}}$$

A atividade enzimática específica foi determinada dividindo o valor obtido com a equação acima pela concentração de proteínas totais obtida com o método de Bradford descrito acima. O valor final foi expresso em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$.

O extrato da marca Pinheiro e os picos oriundos da cromatografia em DEAE-Sepharcel também foram testados em condições diferentes de ensaio de atividade da L-asparaginase, intuindo maximizar a possível atividade da enzima. Nesse caso, 100 μL de amostra foram incubados juntamente com 800 μL de tampão Fosfato de Potássio 0,1 M, pH 7,3, adicionado de L-asparagina 25 mM. Apenas nesse teste, os grupos controles receberam TCA 15 % e 100

μL de amostra correspondente logo no início da reação. Todos foram incubados por 1 h à 37° C.

Após o período de incubação, 100 μL de TCA 15 % foram adicionados nos tubos, com exceção dos grupos controle. Após mistura por inversão, sem centrifugação, 100 μL das amostras foram misturados com 100 μL de reagente de Nessler, sem qualquer diluição. Após misturar por inversão e incubação de 5 minutos, os resultados foram lidos em espectrofotômetro a 450 nm. A referência utilizada pelo espectrofotômetro foi apenas a mistura do tampão com o reagente de Nessler.

3.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

A partir da análise do perfil eletroforético obtido com os experimentos, as bandas presentes no gel foram selecionadas para identificação. Nesse intuito, essas bandas foram excisadas com auxílio de ponteira plástica, picotados com a mesma e transferidos para microtubos identificados.

Após a excisão, as bandas passaram por um processo de redução e alquilação com Ditioneitol (DTT) e Iodoacetamida (IAA), conforme descrito por Shevchenko *et al.* (2007). Após esse processo, as bandas sofreram uma digestão proteolítica com Tripsina por 16 h, à 37° C, a partir do método descrito por Carneiro *et al.* (2021). Após a digestão, os peptídeos foram extraídos a partir do método, mais uma vez, de Shevchenko *et al.* (2007). Os peptídeos extraídos foram, então, solubilizados em ácido fórmico 0,2 % e aplicados numa coluna de fase reversa C18 (75 μm X 20 cm), a qual foi eluída com um gradiente de 10 a 85 % de acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1 %.

O espectrômetro de massas utilizado foi SYNAPT HDMS (Waters, Manchester, UK), o qual é acoplado a um sistema de ESI-nano UPLC. As análises pelo equipamento utilizaram ionização por eletrospray ESI (+) a partir da fonte NanoLockSpray. O equipamento foi previamente calibrado com uma solução de ácido fosfórico e operado como descrito por Carneiro *et al.* (2021). Os espectros de massa gerados foram processados pelo software ProteinLyns Global Server 2.4 (Waters), e os arquivos gerados foram submetidos à análise no programa da MASCOT (Matrix Science Ltda., www.matrixscience.com). O banco de dados utilizado foi o Swissprot.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e purificação de proteínas

A utilização de uma farinha preparada com sementes sem passarem por um processo físico teve o intuito de permitir a extração da maior quantidade de proteínas possível nas condições citadas. A concentração proteica do extrato das sementes de *P. vulgaris* fica evidente na coloração e turbidez do mesmo. Os dados contendo a concentração proteica dos extratos de feijões de diferentes marcas, mensurada pelo método de Bradford (1970), são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Concentração proteica dos extratos de feijão carioca de diferentes marcas

Amostra/Marca	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Desvio padrão	Concentração (mg.ml⁻¹)
Fibra (2017)	0,301	0,314	0,309	0,006	1,268
Fibra (2021)	0,421	0,491	0,475	0,036	4,085
Feijão da casa	0,450	0,448	0,451	0,001	3,958
Pinheiro	0,378	0,319	0,356	0,029	2,972
Karajá	0,427	0,466	0,448	0,019	3,932
Dona dê	0,443	0,481	0,455	0,019	4,058
Granel	0,433	0,425	0,439	0,007	3,785

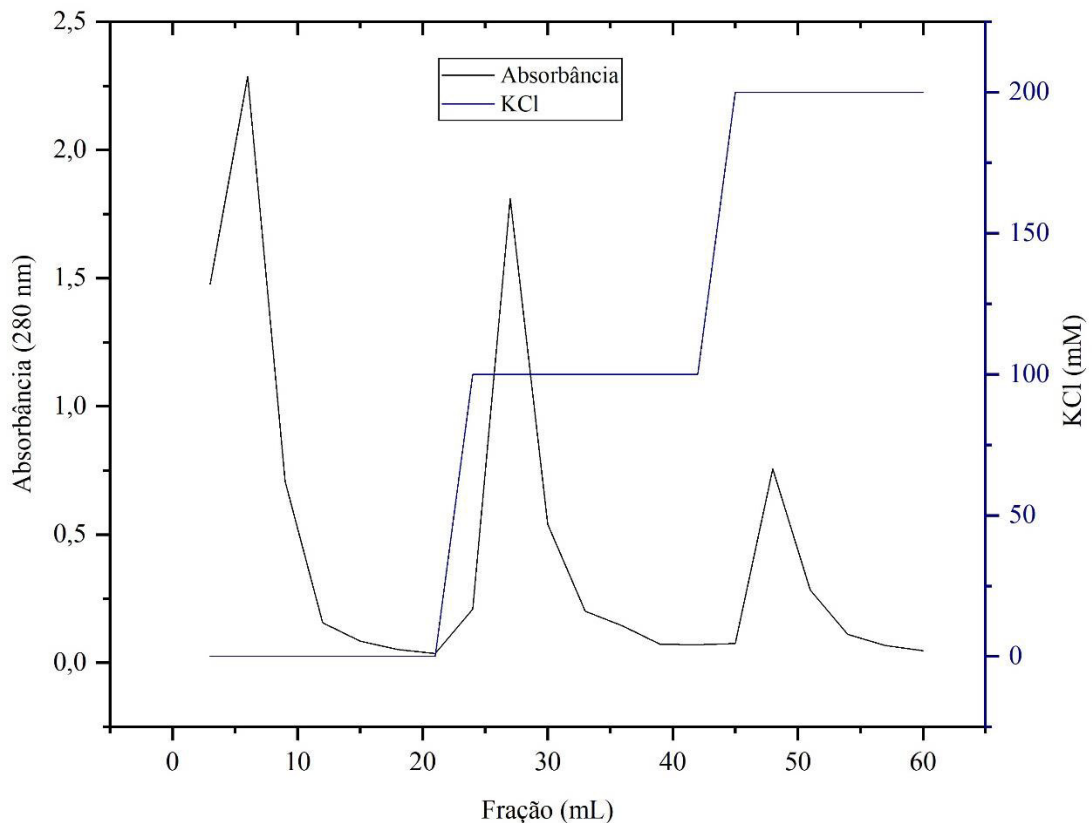
Fonte: Elaborada pelo autor. Abs = absorbância a 595 nm.

Os dados da tabela demonstram que os teores proteicos extraídos das sementes de feijão nas condições citadas no item 3.1 são muito discrepantes. Essas diferenças entre os teores proteicos das diferentes marcas podem ser motivadas por fatores como genótipo da planta, o próprio ambiente de cultivo, localidade e adubação nitrogenada (BURATTO *et al.*, 2009; GOMES JUNIOR; SÁ, 2010).

A concentração mais discrepante é aquela dos feijões da marca Fibra obtidos em 2017. Essa menor quantidade de proteínas em suas sementes pode ser explicada pelo tempo de armazenamento, além das condições não controladas. Até seis meses de armazenamento, feijões refrigerados não têm perda considerável de teor proteico (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, com o envelhecimento do feijão, a estrutura molecular de suas proteínas é modificada, por mais que ainda estejam presentes (RIBEIRO *et al.*, 2009). Nesse contexto, a idade e as condições de armazenamento do feijão Fibra 2017 podem ser as causas para uma menor concentração proteica.

Apenas as marcas Fibra e Pinheiro tiveram seus extratos dialisados e aplicados numa coluna DEAE-Sephacel para uma cromatografia de troca aniônica. Em ambos os casos, a eluição da coluna seguiu-se com adição de concentrações crescentes de KCl ao tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8. Ao analisarmos o perfil cromatográfico obtido a partir do acompanhamento da cromatografia com leituras no espectrofotômetro a 280 nm, nota-se a presença de três picos: um de proteínas não retidas, um eluído com KCl 0,1 M (pico 1) e outro eluído com KCl 0,2 M (pico 2). O perfil possui grande semelhança àquele obtido por Mohamed *et al.* (2015). Ambas as marcas utilizadas apresentaram perfil semelhante, demonstrado na figura 5.

Figura 5 – Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca aniônica DEAE-Sephacel



Fonte: elaborado pelo autor. Cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephacel. Volume da coluna: 5 mL. Volume de extrato aplicado: 5 mL. Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 20 mM, pH 8. Eluição: (1) tampão de equilíbrio, (2) adição de KCl 0,1 M, (3) adição de KCl 0,2 M. Fluxo: 3 mL.min⁻¹.

O extrato utilizado na cromatografia e os picos oriundos da mesma foram preparados para uma eletroforese em condições redutoras em gel SDS-PAGE contendo 12 % de acrilamida. A figura 6 apresenta o resultado do experimento. Nota-se que não foi possível purificar totalmente nenhuma proteína. Entretanto é perceptível a gradativa redução na quantidade de proteínas presentes nas frações com o decorrer das eluições dos picos. Ao comparar o perfil do extrato com aquele do pico não retido, percebe-se que não há muita diferença quanto ao

conteúdo, apenas a concentração proteica. As concentrações proteicas do extrato após a diálise e dos picos eluídos são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração proteica de extrato e frações obtidas em cromatografia DEAE-Sephacel

Amostra	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Desvio padrão	Concentração (mg.mL⁻¹)
Extrato dialisado	0,31	0,364	0,335	0,027	2,825
Pico não-retido	0,425	0,4	0,413	0,012	0,717
Pico retido 1	0,48	0,5	0,486	0,01	0,434
Pico retido 2	0,293	0,32	0,311	0,013	0,254

Fonte: elaborada pelo autor. Abs = absorbância a 595 nm.

Nota-se, pela tabela 2, que a concentração do extrato dialisado é menor quando comparada ao extrato bruto (tabela 1). Essa redução nas proteínas totais solúveis é, provavelmente, causada pela perda de proteínas de baixo peso molecular durante a diálise, uma vez que a membrana utilizada possui poros de 10 kDa. Dessa forma, tudo que possui massa menor que 10 kDa atravessa a membrana e é perdido.

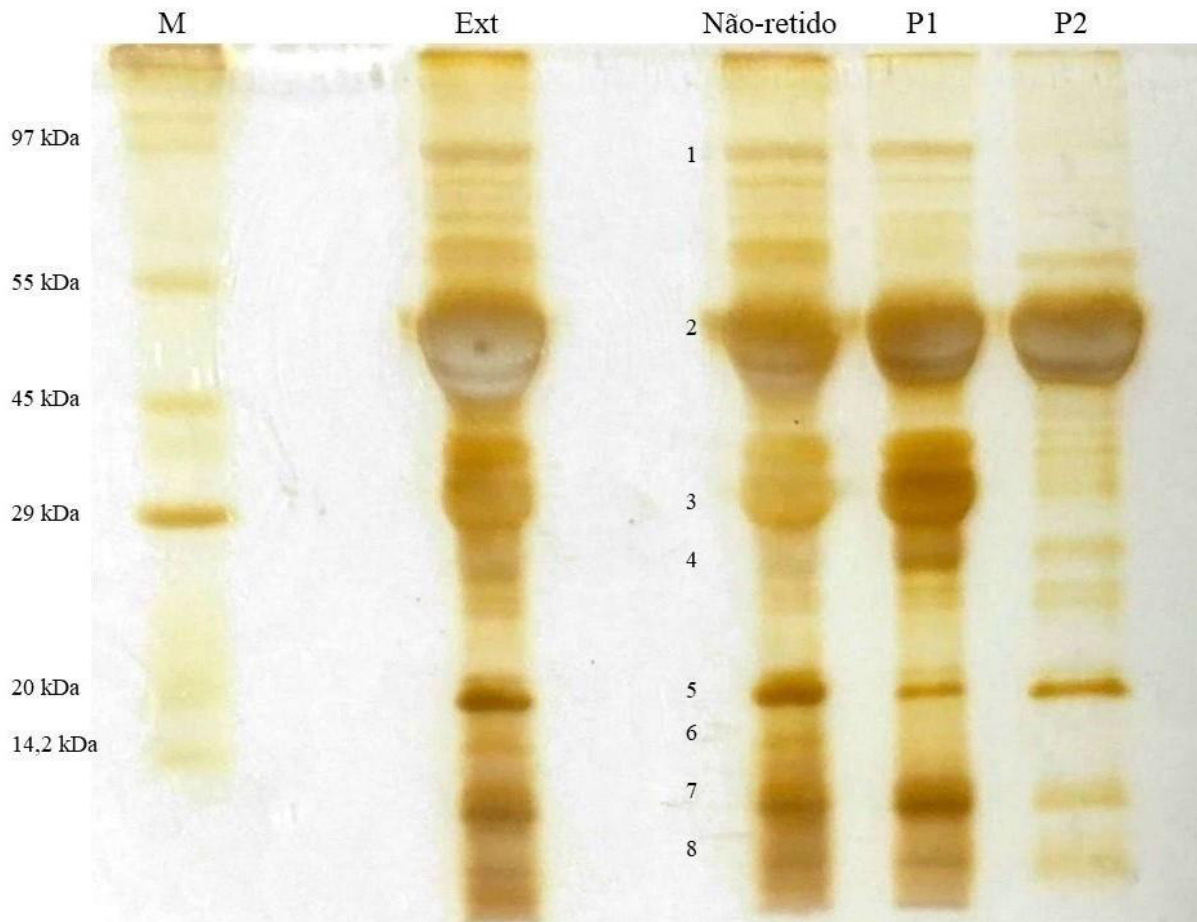
Analisando o perfil eletroforético e a concentração proteica do extrato, é notável que os dados obtidos corroboram com a literatura sobre a grande quantidade de proteínas em sementes de leguminosas e, mais especificamente, *Phaseolus vulgaris* e suas variedades (FIDELIS *et al.*, 2019; GUZMÁN-MALDONADO; ACOSTA-GALLEGOS; PAREDES-LÓPEZ, 2000; LEMES *et al.*, 2019; PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 1989). Ainda na figura 6, há as indicações das bandas excisadas para identificação por espectrometria de massas.

4.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

A identificação das proteínas presentes nas sementes de feijão teve o intuito de tentar encontrar proteínas e, mais especificamente, enzimas com potencial biotecnológico. Pensando nisso, a espectrometria de massas se mostrou um método apropriado para o reconhecimento dessas biomoléculas. Focando, novamente, no gel apresentado na figura 6, vemos que há várias bandas em todos os picos, principalmente no pico não-retido, o qual apresenta a maior quantidade. Optou-se por excisar as bandas do pico não-retido por conter a maior quantidade de bandas, as quais estavam presentes em outros picos, mas em menor concentração. O extrato não foi considerado como opção por ser muito concentrado e não haver uma distinção tão clara entre as bandas.

As tabelas de 3 a 10 apresentam as proteínas identificadas, os peptídeos reconhecidos, suas massas observadas e esperadas, além do valor de delta. Todas as 8 bandas excisadas foram possíveis de identificar, por mais que aquelas com menor peso molecular não fornecessem muito material.

Figura 6 – Perfil eletroforético do extrato e frações de feijão carioca da marca Pinheiro em SDS-PAGE (12 %)



Fonte: elaborado pelo autor. SDS-PAGE 12 % corado por impregnação com nitrato de prata. M = marcador molecular Sigma-Aldrich Wide Range (Miosina 200 kDa; β -galactosidase 116 kDa; Fosforilase B 97 kDa; Albumina 66 kDa; Desidrogenase glutâmica 55 kDa; Ovalbumina 45 kDa; Desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato 36 kDa; Anidrase carbônica 29 kDa; Tripsinogênio 24 kDa; inibidor de tripsina 20 kDa; α -lactalbumina 14,2 kDa e Aprotinina 6,5 kDa). Ext = extrato bruto; Não-retido = pico eluído com o tampão de equilíbrio; P1 = pico eluído com adição de KCl 0,1 M; P2 = pico eluído com adição de KCl 0,2 M. Aplicou-se 3 μ L de extrato, 5 μ L de pico não-retido, e 7 μ L dos picos 1 e 2. 1 a 8 = identificação de bandas excisadas para digestão e identificação por espectrometria de massas.

Os peptídeos gerados a partir da digestão da banda 1 se assemelharam com a sequência da enzima Lipoxigenase-2 (LOX-2) de soja, *Glycine max* (Tabela 3). Lipoxigenases são capazes de catalisar a hidroxidação de lipídeos que contêm porções cis-cis-pentadienos. Essas enzimas têm a característica de possuírem um átomo de ferro em suas estruturas. As lipoxigenases de soja têm uma maior especificidade para os ácidos linolênico e linoleico, os

famosos Ômega 3 e 6 (LOISEAU *et al.*, 2001). Dentre as isoformas encontradas em soja, LOX-2 é a maior entre elas, com aproximadamente 97 kDa. Além dos lipídeos livres, LOX-2 também apresenta a capacidade de atuar em ésteres de biomembranas (MACCARRONE *et al.*, 1994).

Phaseolus vulgaris possui algumas Lipoxigenases purificadas, mas ainda há muito a ser caracterizado dessas enzimas. Não há estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) de lipoxigenases de feijão. Ainda assim, há trabalhos que caracterizam a expressão diferenciada dessas enzimas em diferentes estágios e tecidos da planta, além de diferentes tipos de lipoxigenases. A atividade de LOX-1 e LOX-2 em feijão já foi mensurada em diferentes tecidos, e o tipo 2 apresenta atividade bem maior nos cotilédones se comparado ao tipo 1. Além disso, há a identificação de uma lipoxigenase associada à membrana apoplástica de hipocótilos de *P. vulgaris*. Nesse contexto, apesar da identificação ter relacionado com a LOX-2 de *Glycine max*, identificamos a proteína em questão como LOX-2 de *Phaseolus vulgaris* (GEORG EIBEN; SLUSARENKO, 1994; SICILIA *et al.*, 2005).

Tabela 3 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 1

Banda 1: Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2 OS=Glycine max OX=3847 GN=LOX1.2 PE=2 SV=1			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
K.ELVEVGHGDK.K	1081.5152	1081.5404	-0.0221
K.SSDFLTYGLK.S	1129.4580	1129.5655	0.0085
R.DTMNINALAR.Q + Oxidação (M)	1134.5200	1133.5499	0.00039
R.HASDEVYLGGER.D	1274.5286	1254.5891	-0.0605
R.HASDEIYLGQR.D	1287.5860	1287.6207	-0.0347
K.SAWMTDEEFAR.E + Oxidação (M)	1357.5520	1357.5609	-0.0088
K.SLTLEDVFNQGTIR.F	1541.7808	1541.8049	-0.0241
K.ATFLEGIITSLPTLGAGQSAFK.I	2221.1266	2221.1994	-0.0729
K.ATFLEGIITSLPTLGAGQSAFK.I	2221.1290	2221.1994	-0.0704

Fonte: elaborado pelo autor.

Lipoxigenases possuem aplicações na indústria, principalmente. A LOX de *Glycine max* (soja) é a mais utilizada nessas aplicações, sendo o clareamento de farinhas e pães a partir da redução de carotenoides o potencial mais explorado (SHI *et al.*, 2020). Entretanto, a enzima pode ser utilizada, também, na indústria de química de óleos e na produção de papel e quadros, como bem revisado por Heshof *et al.* (2016).

A banda 2 teve a maior quantidade de peptídeos sequenciados (tabela 4). Tal fato pode ter sido motivado pela grande quantidade de material digerido, uma vez que é a banda mais proeminente no gel de eletroforese (figura 6). Com essa quantidade, os peptídeos apresentaram

similaridade com cerca de 16 % da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína Faseolina, uma proteína de reserva da espécie *P. vulgaris*. Dessa forma, pode-se inferir, justamente, que a grande concentração dessa proteína no extrato se deve ao fato de que sementes de leguminosas, feijão não sendo uma exceção, possuem uma alta reserva proteica (AIDER; BARBANA, 2011; AKIN; OZCAN, 2017; MUNIER-JOLAIN; LARMURE; SALON, 2008; OWUSU-ANSAH; MC CURDY, 1991; SHARIF *et al.*, 2018; WARSAME; O'SULLIVAN; TOSI, 2018).

Tabela 4 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 2

Banda 2: Phaseolin, alpha-type OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 PE=1 SV=1			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
R.LQNLEDYR.L	1050.4346	1049.5141	0.9205
K.TDNVISSIGR.A	1061.4690	1060.5513	0.9178
K.HILEASFNSK.F	1144.4838	1144.5876	-0.1038
K.ETLEYESYR.A	1188.4512	1188.5298	-0.0786
K.RLQNLEDYR.L	1205.4938	1205.6152	-0.1214
K.EGALFVPHYYSK.A	1409.6068	1409.6979	-0.0911
R.SGSAILVLVKPDDR.R	1468.7826	1468.8249	-0.0423
K.GNKETLEFESYR.A	1471.6183	1471.6943	-0.0760
R.SGSAILVLVKPDDR.E	1624.8637	1624.9260	-0.0623
K.IPAGTIFYLVNPDPK.E	1643.7052	1643.8923	-0.1870
R.TDNSLNVLISSIEMK.E	1662.8750	1662.8498	0.0252
K.ATSNVNFTGFGINANNNR.N	2023.8490	2023.9460	-0.0970
R.EYFFLTSDNPIFSDHQK.I	2086.8668	2086.9636	-0.0968
K.QSGSYFVDGHHHQQEQK.G	2138.8849	2138.9518	-0.0669
R.AELSKDDVFPVPAAYPVAIK.A	2144.9290	2145.1721	-0.2432
K.QSGSYFVDAHHHQQEQK.G	2152.8905	2152.9675	-0.0770
R.EYFFLTQGDNPIFSDNQK.I	2161.8638	2161.9957	-0.1318
R.ALDGKDVLTGTFSGSGEEMK.L + Oxidação (M)	2168.1304	2168.0671	0.0633
R.SKPETLLLPQQADAELLVVR.S	2332.2268	2332.3366	-0.1098
R.EEEESQDNPFYFNSDNSWNTLFK.N	2839.2721	2839.1885	0.0836
R.IIQLAMPVNNPQIHEFFLSSTEAQSYLQEFK.H + Oxidação (M)	3853.0249	3852.9032	0.1217

Fonte: elaborado pelo autor.

A Faseolina é uma proteína de reserva, portanto é muito expressa durante o desenvolvimento da semente. A proteína se estrutura como um trímero, o qual pode ser composto de monômeros do tipo α , β ou γ . Os monômeros se diferenciam pelo número de resíduos de aminoácidos e, conseqüentemente, a massa molecular. A α -faseolina possui massa molecular entre 51 e 53 kDa. Por sua vez, a β -faseolina varia entre 47 e 48 kDa. Já a γ -faseolina tem massa entre 43 e 46 kDa. Entretanto, essas massas moleculares podem mudar dependendo

do padrão de glicosilação, o qual pode variar entre diferentes genótipos (KAMI; GEPTS, 1994; LAWRENCE *et al.*, 1994; PAAREN *et al.*, 1987; SLIGHTOM *et al.*, 1985; SUN *et al.*, 1974).

Ratos tratados com faseolina apresentaram reações de hipersensibilidade. Verificou-se que IgE é o principal tipo de anticorpo que se liga à faseolina, apesar de induzir a expressão de outros tipos de anticorpos e citocinas associados a respostas alérgicas. Esses dados indicam essa proteína como um potencial alergênico e que pode afetar pessoas suscetíveis (KUMAR *et al.*, 2014a). Também já foi relatada a capacidade de induzir a secreção de nitrogênio no intestino de ratos e que esse fato pode ser o motivo para seu baixo valor nutricional (SANTORO; GRANT; PUSZTAI, 1999).

Apesar desses dados que apresentam essa proteína como um possível alérgeno e de baixo valor nutricional, estudos veem a faseolina com outro viés, um mais biotecnológico. Nesse contexto, a proteína de reserva pode ser utilizada, especialmente, na produção de biofilmes consumíveis que podem, inclusive, substituir as embalagens plásticas de alimentos (GIOSAFATTO *et al.*, 2014; GIOSAFATTO; MARINIELLO; RING, 2007). Por outro lado, já foi demonstrada a atividade antioxidante e protetora contra danos ao DNA em cólon de ratos (GARCÍA-CORDERO *et al.*, 2021). Esses potenciais biotecnológicos podem ser explorados ainda mais em estudos futuros.

Tabela 5 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 3

Banda 3: Erythroagglutinating phytohemagglutinin OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=DLEC1 PE=1 SV=1			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
K.GGLLGLFNKY.Y	1194.5998	1194.6397	-0.0398
K.TSFIVSDTVDLK.S	1323.6504	1323.6922	-0.0418
K.DKGGLLGLFNKY.Y	1437.7240	1437.7616	-0.0375
K.GENAEVLITYDSSTK.L	1625.7374	1625.7784	-0.0410
K.GNVETNDVLSWSFASK.L	1752.8426	1752.8319	0.0108
R.LTNVNDNGEPTLSSLGR.A	1785.7568	1785.8857	-0.1288
K.LSDGTTSEGLNLANLVLNK.I	1957.9758	1958.0320	-0.0562

Fonte: elaborado pelo autor.

Como podemos observar na tabela 5, os peptídeos sequenciados a partir da banda 3 apresentaram similaridade com a Fitohemaglutinina Eritohemaglutinante de *P. vulgaris*, ou PHA-E. Essa lectina possui uma estrutura semelhante a várias outras lectinas vegetais, e possui dois tipos de monômeros: um que se liga e aglutina eritrócitos e outro que faz o mesmo com leucócitos, chamada PHA-L. Esses monômeros podem formar tetrâmeros constituídos por

diferentes quantidades de PHA-E e PHA-L. Ambos os tipos se ligam a carboidratos complexos e possuem os íons Ca^{2+} e/ou Mn^{2+} ligados próximos dos sítios de ligação, de forma que auxiliam numa melhor afinidade pelos açúcares. Tanto PHA-L quanto PHA-E possuem estruturas depositadas no PDB, as quais evidenciam as diferenças estruturais de ligação a carboidratos e a alta afinidade por N-glicanos (HAMELRYCK *et al.*, 1996; HE *et al.*, 2018; LORIS *et al.*, 1998; NAGAE *et al.*, 2014).

PHA é uma lectina muito resistente a tratamentos térmicos e proteolíticos, além de ser capaz de induzir respostas imunológicas em ratos e humanos, tornando-a um alérgeno vegetal (KUMAR *et al.*, 2014b). Apesar disso, a lectina possui aplicações pertinentes, como sua capacidade mitogênica utilizada em culturas de leucócitos (BADARI NATH *et al.*, 2015). Além disso, a proteína tem possíveis aplicações na saúde humana, uma vez que apresenta atividade antifúngica, antitumoral e atua, inclusive, como antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ANG *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2010, 2011; LAM; NG, 2011). Essas potencialidades ainda podem ser bastante exploradas em trabalhos futuros.

Tabela 6 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 4

Banda 4: Phaseolin, beta-type OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 PE=1 SV=2			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
R.LQNLEDYR.L	1049.4760	1049.5141	-0.0381
K.HILEASFNSK.F	1144.5592	1144.5876	-0.0284
K.RLQNLEDYR.L	1205.5902	1205.6152	-0.0250
K.IPAGTIFYLVNPDPK.E	1643.8492	1643.8923	-0.0430
R.AELSKDDV FVIPAA YPVAIK.A	2145.1264	2145.1721	-0.0458
K.IPAGTIFYLVNPDPKEDLR.I	2157.0967	2157.1470	-0.0503
R.SKPETLLLPQQADAELLVVR.S	2332.2970	2332.3366	-0.0396

Fonte: elaborado pelo autor.

As bandas 4 e 5 foram, ambas, identificadas como Faseolina do tipo beta (tabelas 6 e 7). Quando se compara esses resultados com o gel de eletroforese, pode haver uma descrença, mas a literatura relata que a β -faseolina pode sofrer fragmentação durante seu transporte para as vesículas de estoque proteico. As bandas obtidas em eletroforese desses fragmentos apresentam massa molecular, justamente, entre 20 e 25 kDa, como observado na figura 6 (PEDRAZZINI *et al.*, 1997).

Por fim, temos as 3 últimas bandas: 6, 7 e 8. Todas elas foram identificadas como a proteína inibidora de α -amilase de *P. vulgaris*. As tabelas 8 a 10 apresentam os dados usados para a identificação das bandas. Ao analisar os peptídeos sequenciados das bandas 6 e 8,

percebe-se a quantidade mínima de dados obtidos. Isto pode se dever ao fato de, ao olhar o gel (figura 6), vemos a pequena quantidade de material disponível para excisão, visto que possuem baixa concentração nas frações utilizadas. Apesar da pequena quantidade de dados, foi possível identificar as duas bandas.

Tabela 7 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 5

Banda 5: Phaseolin, beta-type OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 PE=1 SV=2			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
K.ETLEYESYR.A	1188.4960	1188.5298	-0.0338
K.GNKETLEYESYR.A	1487.7102	1487.6892	0.0211
K.IPAGTIFYLVNPDPK.E	1643.8480	1643.8923	-0.0442
R.TDNSLNVLISSEMK.E	1662.8098	1662.8498	-0.0400
R.AELSKDDVFIPIAAYPVAIK.A	2145.0865	2145.1721	-0.0857
K.QSGSYFVDAHQQEQK.G	2152.9093	2152.9675	-0.0582
K.IPAGTIFYLVNPDPKEDLR.I	2157.0961	2157.1470	-0.0509

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 8 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 6

Banda 6: Alpha-amylase inhibitor 1 OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=LLP PE=1 SV=1			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
K.SVPWDVHDYDGQNAEVR.I	1985.8306	1985.8868	-0.0562

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 9 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 7

Banda 7: Alpha-amylase inhibitor 1 OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=LLP PE=1 SV=1			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
R.AFYSAPIQIR.D	1164.5748	1164.6291	-0.0543
R.ISIDVNNNDIK.S	1243.4756	1243.6408	-0.1652
K.SNNVSTTVELEK.E	1320.5878	1319.6569	0.9310
K.GDTVTVEFDTFLSR.I	1585.7224	1585.7624	-0.0400
K.SVPWDVHDYDGQNAEVR.I	1985.7674	1985.8868	-0.1193

Fonte: elaborado pelo autor.

O inibidor de α -amilase de feijão é uma glicoproteína que apresenta semelhança com as lectinas da mesma espécie. A proteína apresenta um teor alto de glicosilação, mais de 15 % em alguns casos. Ela é expressa como um precursor polipeptídico, o qual, ao chegar à vesícula de estoque proteico de cotilédones, sofre clivagem e é dividido em polipeptídeos ativos do inibidor. Estes possuem massa molecular entre 14 e 18 kDa, massa semelhante àquela apresentada pela Banda 6.

Tabela 10 – Peptídeos sequenciados, massas e identificação da Banda 8

Banda 8: Alpha-amylase inhibitor 1 OS=Phaseolus vulgaris OX=3885 GN=LLP PE=1 SV=1			
Sequência peptídica	Massa observada	Massa calculada	Δ
R.ISIDVNNNDIK.S	1243.5552	1243.6408	-0.0856
K.SVPWDVHDYDGQNAEVR.I	1985.8274	1985.8868	-0.0593

Fonte: elaborado pelo autor.

Entretanto, as bandas 7 e 8 possuem massa menor e, mesmo assim foram identificadas como inibidor de α -amilase. Alguns trabalhos relatam que, quando deglicosiladas, as subunidades alfa e beta da glicoproteína apresentam massa molecular menor do que 10 kDa. Entretanto, não houve nenhum tratamento nas amostras utilizadas neste trabalho que visassem a deglicosilação de proteínas. Dessa forma, pode haver uma expressão diferenciada do padrão de glicosilação do inibidor no cultivar utilizado nesse trabalho ou sequer há glicosilação nessas proteínas. Para confirmar tal hipótese, talvez seja necessário purificar e caracterizar o precursor polipeptídico e seu padrão de glicosilação (LEE; GEPTS; WHITAKER, 2002; MORENO; ALTABELLA; CHRISPEELS, 1990; NAKAGUCHI *et al.*, 1997; YAMAGUCHI, 1991).

O inibidor de α -amilase é considerado uma proteína de defesa da planta contra animais predatórios, com maior ênfase em insetos, principalmente porque essa glicoproteína inibe amilases animais, mas não as oriundas de vegetais. A partir dessa característica, esse inibidor possui um grande potencial como inseticida, especialmente contra espécies mais generalistas, as quais não co-evoluíram com o gênero *Phaseolus*. Através de transgenia, seria possível cultivar plantas que expressam esse inibidor e sejam mais resistentes à herbivoria (KLUH *et al.*, 2005).

Ademais, o inibidor de alfa-amilase já se demonstrou como um potencial aliado poderoso no tratamento de síndrome metabólica. Em ratos nos quais a síndrome foi induzida pela dieta administrada, a aplicação de 0,5 g.kg⁻¹ da glicoproteína em questão reduziu drasticamente os sintomas e efeitos bioquímicos e metabólicos causados pela síndrome. Dessa forma, houve redução da glicemia, dos níveis de colesterol, triglicerídeos, além de diminuir a massa corporal, entre outros efeitos benéficos (MICHELI *et al.*, 2019). Nesse contexto, visto os benefícios da administração do inibidor de α -amilase em ratos com síndrome metabólica, é notório o potencial da aplicação dessa proteína na saúde humana.

Analisando o conjunto de proteínas encontradas, nota-se a semelhança dos dados obtidos com alguns trabalhos na literatura, como a proteômica das sementes de *Vicia faba* e,

também, da mesma espécie utilizada neste trabalho, *Phaseolus vulgaris* (PASTORCORRALES *et al.*, 2013; WARSAME *et al.*, 2020; WARSAME; O’SULLIVAN; TOSI, 2018). Analisando as proteínas identificadas e a literatura citada, nota-se que, de fato, há sobreposição de dados, de forma a corroborá-los. Todas as proteínas identificadas também foram encontradas por outros autores, sejam iguais ou apenas semelhantes, como as de *Vicia faba*. Além disso, as proteínas mais abundantes e identificadas são, exatamente, Faseolina, PHA e Inibidor de alfa-amilase (DE LA FUENTE *et al.*, 2011). Essa literatura suporta os dados descritos aqui, principalmente porque o mesmo método foi utilizado para a identificação, espectrometria de massas.

4.3 Detecção da atividade enzimática de L-asparaginase

Visto que um dos intuitos desse trabalho foi encontrar possíveis enzimas com potencial biotecnológico nas sementes de feijão carioca, apesar de as identificações por espectrometria não terem apresentado essa enzima, foram realizados ensaios de atividade de L-asparaginase com os extratos e picos oriundos da cromatografia DEAE-Sephacel, uma vez que há na literatura relato de purificação e testes com a enzima provinda da mesma espécie (MOHAMED *et al.*, 2015, 2016).

Como dito no item 3.1, diversas marcas de feijão carioca foram testadas. Dentre estas, apenas os extratos e frações da marca Fibra 2017 apresentaram alguma atividade de L-asparaginase. A tabela 11 apresenta as concentrações proteicas e a atividade de cada fração obtida com essa marca em específico. Como mencionado anteriormente, Fibra 2017 foi comprada há vários anos e foi estocada em condições inconstantes em termos de temperatura e umidade. A concentração proteica obtida em seu extrato é mais de duas vezes menor do que aquelas adquiridas a partir de outras marcas recém compradas.

A partir dos resultados obtidos com a marca Fibra 2017, esperava-se encontrar atividade de L-asparaginase em feijões de outras marcas, mas da mesma variedade. Entretanto, não foi como o esperado. Pelo contrário, nenhuma outra marca testada apresentou atividade enzimática, inclusive Fibra 2021. A tabela 12 mostra as absorbâncias obtidas nas leituras a 425 nm dos testes de atividade asparaginásica das diferentes marcas testadas.

Tabela 11 – Concentração proteica e atividade de L-asparaginase da marca Fibra 2017

Amostra	Concentração (mg.mL⁻¹)	[NH₃] (μmol.mL⁻¹)	Atividade (U.mL⁻¹)	Atv. Específica (U.mg⁻¹)
Extrato	1,16	0,12	0,4	0,34
Pico não-retido	399,82	0,09	0,3	0,75
Pico retido 1	0,0326	0,06	0,2	6,13
Pico retido 2	0,161	0,009	-	-

Fonte: elaborado pelo autor. Extensão da curva de NH₃: 0,05 a 0,95 μmol.mL⁻¹.

Tabela 12 – Comparação dos resultados do teste de atividade asparaginásica com extratos de diferentes marcas de feijão carioca

Marca	Controle	Teste 1	Teste 2
Fibra (2017)	0,041	0,242	0,254
Fibra (2021)	0,388	0,378	0,379
Feijão da casa	0,044	0,041	0,039
Pinheiro	0,03	0,031	0,03
Karajá	0,032	0,041	0,043
Dona dê	0,032	0,038	0,039
Granel	0,027	0,037	0,036

Fonte: elaborado pelo autor. Leituras feitas no comprimento de onda de 425 nm

Como podemos perceber pelos dados da Tabela 12, exceto pelo feijão Fibra 2017, nenhum feijão apresentou atividade enzimática significativa de L-asparaginase. Notemos que, em especial o caso de Fibra 2021, há extratos em que o grupo controle possui absorvância maior que os próprios testes. Visto que uma alíquota da amostra é pipetada no grupo controle logo após a parada da reação com TCA 15 %, acredita-se que há possíveis interferentes do teste presentes nesses extratos, como amônia livre e outros compostos nitrogenados (HARBORNE, 1973), de forma que reagem com o reagente de Nessler. Fibra 2021 apresentaria a maior quantidade de interferentes, os quais reagiram com o reagente colorimétrico e produziu a coloração amarela característica. Esse resultado se repetiu para os testes feitos com as frações oriundas da cromatografia de troca aniônica e o teste em que todas as condições foram maximizadas para tentar mensurar alguma atividade.

Os dados obtidos com os experimentos não são, de forma alguma, semelhantes àqueles relatados por Mohamed *et al.* (2015), até no caso de Fibra 2017. Os autores afirmam terem

utilizado sementes maduras para os testes e relatam atividades específicas de 131 e 834 U.mg⁻¹ para a fração não-retida da cromatografia em DEAE-Sepharose e a enzima pura, respectivamente. Por mais que as condições dos experimentos realizados neste trabalho sejam muito semelhantes às aquelas descritas pelos autores, os resultados obtidos são extremamente discrepantes. Para tentar explicar essa diferença, algumas hipóteses foram pensadas.

Primeiramente, há a possibilidade de a enzima L-asparaginase ter sido degradada por alguma protease presente nas sementes de feijão durante o processo de extração. Há na literatura purificação e caracterização de proteases de sementes de leguminosas, como serino-proteases e semelhantes à tripsina (NISHIKATA, 1984; PACHECO; SILVA-LOPEZ, 2012; PRAXEDES-GARCIA *et al.*, 2012; WILSON; TAN-WILSON, 1987). Pensando nisso, a adição de um inibidor de proteases no tampão de extração proteica das sementes pode ser uma condição que auxilie na obtenção da enzima de interesse, uma vez que um inibidor é utilizado por Mohamed *et al.* (2015).

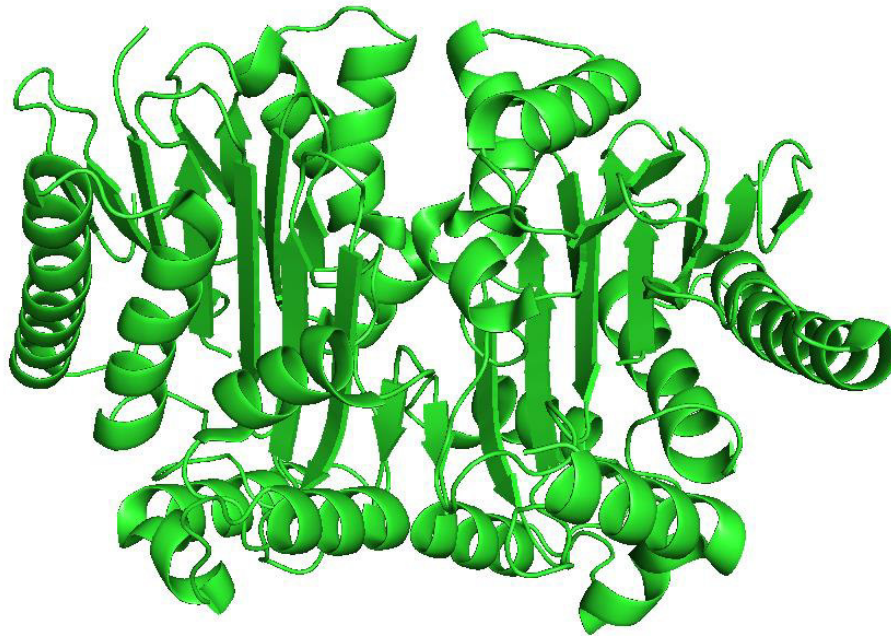
Outra hipótese levantada é de que a ausência de atividade de L-asparaginase nos extratos testados se deve à variedade de *Phaseolus vulgaris* utilizada neste trabalho. Mohamed *et al.* (2015) utiliza em seus experimentos uma variedade da espécie cultivada no Egito, chamada de Giza 6. A variedade utilizada neste trabalho foi a Carioca, variedade cultivada aqui no Brasil. Apesar de serem da mesma espécie, a diferença entre variedades pode ser uma justificativa para a diferença de expressão de L-asparaginase em sementes maduras, uma vez que há diferença de genótipo entre os mais variados cultivares de *P. vulgaris* (BITOCCHI *et al.*, 2012; BURATTO *et al.*, 2009).

Acredita-se que, para encontrar atividade de L-asparaginase em sementes de feijão carioca, seja necessário utilizar sementes em estágio de desenvolvimento ou início de germinação nos experimentos, pois são momentos em que há a necessidade de degradação proteica e transporte de nitrogênio entre os tecidos vegetais (ATKINS; PATE; SHARKEY, 1975). Dessa forma, seria possível avaliar efetivamente a atividade dessa enzima obtida a partir dessa variedade.

É importante ressaltar que, até o momento, somente Mohamed *et al.* (2015) foi capaz de purificar e caracterizar a L-asparaginase de *P. vulgaris* obtida a partir da fonte natural, ou seja, a planta em si. A enzima possui estruturas bem resolvidas depositadas no PDB (figura 7), mas todas tiveram a enzima expressa heterologicamente em *Escherichia coli* e purificada para os experimentos que se seguiram nesses estudos (AJEWOLE *et al.*, 2018; BEJGER *et al.*, 2014).

Talvez essa seja a estratégia mais promissora para que se possa obter, definitivamente, uma L-asparaginase ativa e pura de feijão carioca.

Figura 7 – Estrutura de L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris*



Fonte: PDB (4PU6) (BEJGER *et al.*, 2014).

O interesse em L-asparaginase surge de sua aplicação biotecnológica imprescindível no tratamento auxiliar quimioterápico de alguns tipos de cânceres, mais especificamente a Leucemia Linfóide Aguda (LLA), além do seu uso na indústria alimentícia, reduzindo a formação de acrilamida em alguns alimentos quando superaquecidos (CECCONELLO *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2017; VIMAL; KUMAR, 2017). As L-asparaginases de *Escherichia coli* e *Erwinia sp.* já são bem caracterizadas e comercializadas, além de serem utilizadas no tratamento de LLA (BECKETT; GERVAIS, 2019; CECCONELLO *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2017; MARINI *et al.*, 2017; SALZER; SEIBEL; SMITH, 2012; VIMAL; KUMAR, 2017).

A L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* poderia se tornar uma ótima substituta para as enzimas bacterianas utilizadas no tratamento de câncer, pois estas tendem a causar reações de hipersensibilidade nos pacientes tratados com suas preparações, inclusive com a variedade da enzima de *E. coli* desenvolvida especificamente num esforço de diminuir essas reações alérgicas (ALI *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2019; BATOOL *et al.*, 2016; DE ARAÚJO *et al.*, 2021; LANVERS-KAMINSKY, 2017). Há na literatura apenas um trabalho que avalia os efeitos causados pela administração da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* em ratos com

LLA e compara com as enzimas comerciais, demonstrando a capacidade de diminuir a L-asparagina disponível no meio de forma tão eficiente quanto as preparações bacterianas e, praticamente, sem nenhum efeito adverso (MOHAMED *et al.*, 2016). Apesar dessa falta de dados sobre a enzima provinda de feijão, outras plantas possuem L-asparaginases purificadas e mais caracterizadas (BANO; SIVARAMAKRISHNAN, 1980; CREDALI *et al.*, 2011, 2013; SODEK; LEA; MIPLIN, 1980).

Acredita-se que este foi um estudo introdutório e que revela as potencialidades das proteínas presentes nas sementes maduras de feijão carioca, *Phaseolus vulgaris*. Infelizmente, uma enzima de muito interesse não pôde ser identificada pelos métodos utilizados. Entretanto, todo o empenho gerou conhecimentos que serão prontamente empregados em novas estratégias para conseguir purificar e caracterizar melhor a L-asparaginase dessa espécie. As proteínas que foram identificadas não serão esquecidas, pois criam perspectivas sobre potenciais ainda a serem explorados em possíveis estudos futuros.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível identificar 4 proteínas a partir do extrato de sementes maduras de feijão carioca: a enzima Lipoxigenase, a proteína de reserva Faseolina (Alfa e Beta), a Lectina Hemaglutinante PHA-E, e a glicoproteína inibidora de α -amilase. Dessa forma, visto que os esforços desse estudo se motivaram pela procura por enzimas, apenas uma foi identificada pelos métodos empregados. Entretanto, todas as proteínas encontradas possuem alguma aplicação biotecnológica e merecem maior atenção, pois ainda possuem potenciais pouco ou nada explorados.

Infelizmente, uma enzima de muito interesse não foi identificada por espectrometria de massas ou pelo seu ensaio enzimático em várias marcas de feijão testadas. Acredita-se que é necessário utilizar sementes em desenvolvimento ou início de germinação para que se possa identificar e purificar a L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris*. Expressão heteróloga seria uma outra estratégia a ser analisada. Apesar disso, os resultados negativos lançam luz nas abordagens a serem utilizadas em estudos futuros, os quais se fazem necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AH, Lichtenstein *et al.* Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, [S. l.], v. 114, n. 1, p. 82–96, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.176158>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- AIDER, Mohammed; BARBANA, Chockry. Canola proteins: Composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 21–39, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.002>
- AJEWOLE, Ebenezer *et al.* Structural basis of potassium activation in plant asparaginases. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 285, n. 8, p. 1528–1539, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.14428>
- AKIN, Zeynep; OZCAN, Tulay. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 86, p. 25–30, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.025>
- ALI, Usman *et al.* L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 771, p. 199–210, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.023>
- ANG, Andrew Si Wo *et al.* Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from phaseolus vulgaris cv. Chinese Pinto Beans with antiproliferative activity towards nasopharyngeal carcinoma cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 172, n. 2, p. 672–686, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0542-2>
- ARAÚJO, Sebastião José de. **FEIJÃO CARIOCA BRS 10408**. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/2179001/feijao-carioca-brs-10408>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- ATKINS, Craig A.; PATE, John S.; SHARKEY, Patrick J. Asparagine Metabolism—Key to the Nitrogen Nutrition of Developing Legume Seeds. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 807–812, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/PP.56.6.807>. Acesso em: 28 ago. 2021.
- AY, Cheng. Canadian Diabetes Association 2013 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada. Introduction. **Canadian journal of diabetes**, [S. l.], v. 37 Suppl 1, n. SUPPL.1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCJD.2013.01.009>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- BADARI NATH, A. R. S. *et al.* A comparative study of phytohaemagglutinin and extract of Phaseolus vulgaris seeds by characterization and cytogenetics. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 134, p. 143–147, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.05.086>
- BANO, Mozeena; SIVARAMAKRISHNAN, V. M. Preparation and properties of L-asparaginase from green chillies (*Capsicum annum* L.). **Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 291–297, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02716861>
- BARBOSA, Khrisna Fiuza *et al.* Reações adversas ao medicamento L-asparaginase em pacientes oncopediátricos. **Vigilância Sanitária em Debate**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 46–50, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01295>

BARILI, Leiri Daiane *et al.* Genotype-environment interaction in common bean cultivars with carioca grain, recommended for cultivation in Brazil in the last 40 years. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 244–250, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1984-70332015v15n4a41>

BATOOL, Tahira *et al.* A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1917-3>

BECERRA-TOMÁS, Nerea; PAPANDREOU, Christopher; SALAS-SALVADÓ, Jordi. Legume Consumption and Cardiometabolic Health. **Advances in Nutrition**, [S. l.], v. 10, n. Suppl 4, p. S437, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMZ003>. Acesso em: 29 ago. 2021.

BECKETT, Angela; GERVAIS, David. What makes a good new therapeutic l-asparaginase? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2731-9>

BEJGER, Magdalena *et al.* Na⁺/K⁺ exchange switches the catalytic apparatus of potassium-dependent plant L-asparaginase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 70, n. 7, p. 1854–1872, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S1399004714008700>

BENKO-ISEPPON, Ana Maria; CROVELLA, Sergio. Ethnobotanical Bioprospection of Candidates for Potential Antimicrobial Drugs from Brazilian Plants: State of Art and Perspectives. **Current Protein & Peptide Science**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 189–194, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138920310791112129>

BITOCCHI, Elena *et al.* Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 14, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1108973109>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of proteindye binding. **Anal Biochem.**, USA, v. 72, p. 248–534, 1977.

BURATTO, Juliana Sawada *et al.* Variabilidade genética e efeito do ambiente para o teor de proteína em grãos de feijão. **Acta Scientiarum - Agronomy**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 593–597, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i4.910>

CABELLO-HURTADO, Francisco *et al.* Proteomics for exploiting diversity of lupin seed storage proteins and their use as nutraceuticals for health and welfare. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 143, p. 57–68, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.026>

CARNEIRO, R. F.; AGUIAR, E. S.; SANTOS, V. F.; *et al.* Elucidation of the primary structure and molecular modeling of *Parkia pendula* lectin and in vitro evaluation of the leishmanicidal activity. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 1–10, 2021. Elsevier.

CECCONELLO, Daiane Keller *et al.* Asparaginase: an old drug with new questions. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 275–282, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.07.010>

CLAUS, Achim; CARLE, Reinhold; SCHIEBER, Andreas. Acrylamide in cereal products: A review. **Journal of Cereal Science**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 118–133, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.016>

CORTE, A. D. *et al.* Environment effect on grain quality in early common bean cultivars and lines. **Cropps Breeding and Applied Biotechnology**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 193–202, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v03n03a03>

CREDALI, Alfredo *et al.* Structural analysis of K⁺ dependence in l-asparaginases from *Lotus japonicus*. **Planta**, [S. l.], v. 234, n. 1, p. 109–122, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1393-0>

CREDALI, Alfredo *et al.* The K⁺-dependent asparaginase, NSE1, is crucial for plant growth and seed production in *lotus japonicus*. **Plant and Cell Physiology**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 107–118, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs156>

DE ARAÚJO, Talita Stelling *et al.* Biophysical characterization of two commercially available preparations of the drug containing *Escherichia coli* L-Asparaginase 2. **Biophysical Chemistry**, [S. l.], v. 271, n. January, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106554>

DE LA FUENTE, M. *et al.* 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 262–267, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2010.10.004>

DE OLIVEIRA, Viviani Ruffo *et al.* Qualidade para o cozimento e composição nutricional de genótipos de feijão com e sem armazenamento sob refrigeração. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 746–752, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000050>

DICKERSON, R. E.; KENDREW, J. C.; STRANDBERG, B. E. The crystal structure of myoglobin: Phase determination to a resolution of 2 Å by the method of isomorphous replacement. **Acta Crystallographica**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 1188–1195, 1961. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/s0365110x61003442>. Acesso em: 29 ago. 2021.

EOM, Soo Hyun; WANG, Jimin; STEITZ, Thomas A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. **Nature** **1996 382:6588**, [S. l.], v. 382, n. 6588, p. 278–281, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/382278a0>. Acesso em: 29 ago. 2021.

FANG, Evandro Fei *et al.* A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Extralong Autumn Purple Bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 2221–2229, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf903964u>

FANG, Evandro Fei *et al.* A new *Phaseolus vulgaris* lectin induces selective toxicity on human liver carcinoma Hep G2 cells. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 85, n. 12, p. 1551–1563, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0698-x>

FIDELIS, Rodrigo Ribeiro *et al.* Determinação do teor de proteína em genótipos de feijão comum cultivados em diferentes níveis de nitrogênio. **Ambiência**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 161–172, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/ambiencia.2019.01.10>

FORZZA, Rafaela C. *et al.* Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. [S. l.], v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566411>

GALLARDO, Karine; THOMPSON, Richard; BURSTIN, Judith. Reserve accumulation in

legume seeds. **Comptes Rendus - Biologies**, [S. l.], v. 331, n. 10, p. 755–762, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.017>

GARCÍA-CORDERO, Juan Manuel *et al.* Phaseolin, a protein from the seed of *Phaseolus vulgaris*, has antioxidant, antigenotoxic, and chemopreventive properties. **Nutrients**, [S. l.], v. 13, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu13061750>

GEORG EIBEN, Hans; SLUSARENKO, Alan J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **The Plant Journal**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 123–135, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.5010123.x>

GIOSAFATTO, C. Valeria L. *et al.* Characterization of Citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 106, p. 200–208, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.015>

GIOSAFATTO, Concetta V. L.; MARINIELLO, Loredana; RING, Steve. Extraction and characterization of *Foeniculum vulgare* pectins and their use for preparing biopolymer films in the presence of phaseolin protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 1237–1240, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf062725d>

GOMES JUNIOR, Francisco Guilhien; SÁ, Marco Eustáquio De. Proteína e qualidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em função da adubação nitrogenada em plantio direto. **Revista Brasileira de Sementes**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 34–44, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0101-31222010000100004>

GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, [S. l.], v. 53, n. 1–3, p. 131–146, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00112-3)

GUZMÁN-MALDONADO, Salvador H.; ACOSTA-GALLEGOS, Jorge; PAREDES-LÓPEZ, Octavio. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 80, n. 13, p. 1874–1881, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1874::AID-JSFA722>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1874::AID-JSFA722>3.0.CO;2-X)

HAMELRYCK, Thomas W. *et al.* The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 271, n. 34, p. 20479–20485, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20479>

HARBORNE, J. B. Nitrogen Compounds. **Phytochemical Methods**, [S. l.], p. 166–211, 1973. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7_5. Acesso em: 28 ago. 2021.

HE, Shudong *et al.* *Phaseolus vulgaris* lectins: A systematic review of characteristics and health implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 70–83, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096234>

HERMAN, Eliot M.; LARKINS, Brian A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 601–613, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.601>

JARPA-PARRA, M. *et al.* Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 132, p. 45–53, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.04.065>

- Ji, Mann *et al.* Evidence-based nutritional approaches to the treatment and prevention of diabetes mellitus. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 373–394, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0939-4753\(04\)80028-0](https://doi.org/10.1016/S0939-4753(04)80028-0). Acesso em: 29 ago. 2021.
- KAMI, J. A.; GEPTS, Paul. Phaseolin nucleotide sequence diversity in Phaseolus. I. Intraspecific diversity in Phaseolus vulgaris. **Genome**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 751–757, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/g94-107>
- KHODAEI, Diako; CARLOS, Á.; MULLEN, Anne Maria. Biodegradable Packaging Materials from Animal Processing Co-Products and Wastes: An Overview. **Polymers**, [S. l.], 2021. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4360/13/15/2561?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RES_R_MRKT_Researcher_inbound
- KLUH, Ivan *et al.* Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α -amylase inhibitor from Phaseolus vulgaris. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 31–39, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.11.001>
- KRISHNAN, Hari B.; OEHRLE, Nathan W.; NATARAJAN, Savithiry S. A rapid and simple procedure for the depletion of abundant storage proteins from legume seeds to advance proteome analysis: A case study using Glycine max. **Proteomics**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 3174–3188, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.200800875>
- KUMAR, Sandeep *et al.* International Immunopharmacology Phaseolin : A 47 . 5 kDa protein of red kidney bean (Phaseolus vulgaris L .) plays a pivotal role in hypersensitivity induction. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 178–190, 2014 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.01.014>
- KUMAR, Sandeep *et al.* Leucoagglutinating phytohemagglutinin: Purification, characterization, proteolytic digestion and assessment for allergenicity potential in BALB/c mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 138–144, 2014 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.884136>
- LAKSANALAMAI, Pongpan; ROBB, Frank T. Small heat shock proteins from extremophiles: A review. **Extremophiles**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0362-3>
- LAM, Sze Kwan; NG, Tzi Bun. Apoptosis of human breast cancer cells induced by hemagglutinin from Phaseolus vulgaris cv. Legumi secchi. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 126, n. 2, p. 595–602, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.049>
- LANVERS-KAMINSKY, Claudia. Asparaginase pharmacology: Challenges still to be faced. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 439–450, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3236-y>
- LÁSARO, Carlos. **Soja BRS 413RR**. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/3597001/soja-brs-413rr>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- LAWRENCE, M. C. *et al.* Structure of Phaseolin at 2.2 Å Resolution: Implications for a Common Vicilin/Legumin Structure and the Genetic Engineering of Seed Storage Proteins. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 238, n. 5, p. 748–776, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/JMBI.1994.1333>
- LEE, Shih Chieh; GEPTS, Paul L.; WHITAKER, John R. Protein structures of common bean

- (Phaseolus vulgaris) α -amylase inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 50, n. 22, p. 6618–6627, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf020189t>
- LEMES, Ailton Cesar *et al.* Potencial Antioxidante de Proteínas Extraídas de Feijão Comum (Phaseolus vulgaris) cv. BRSMG-Madrepérola. **Uniciências**, [S. l.], v. 22, n. 3Esp, p. 38, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2018v22n3espp38-42>
- LEMOS, Leandro Borges *et al.* Características agronômicas e tecnológicas de genótipos de feijão do grupo comercial Carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 319–326, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2004000400004>
- LEWIS, Gwilym *et al.* **Lewis, Gwilym - Legumes of the world-The Royal Botanic Gardens (2005).pdf**. [S. l.: s. n.]
- LL, Fu *et al.* Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 1442–1449, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2011.07.004>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- LOISEAU, Jacques *et al.* Seed lipoxygenases: Occurrence and functions. **Seed science research**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 199–211, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/SSR200176>
- LOPES, André Moreni *et al.* Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 82–99, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1120705>
- LORIS, Remy *et al.* Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [S. l.], v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00182-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00182-9)
- MACCARRONE, Mauro *et al.* In vitro oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2. **BBA - Biomembranes**, [S. l.], v. 1190, n. 1, p. 164–169, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90046-9)
- MACEDO, Maria Lígia Rodrigues *et al.* Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae), Zabrotes subfasciatus and Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], v. 146, n. 4, p. 486–498, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.020>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- MACHER, Bruce A.; YEN, Ten Yang. Proteins at membrane surfaces - A review of approaches. **Molecular BioSystems**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 705–713, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b708581h>
- MAŁECKI, Jan; MUSZYŃSKI, Siemowit; SOŁOWIEJ, Bartosz G. Proteins in Food Systems—Bionanomaterials, Conventional and Unconventional Sources, Functional Properties, and Development Opportunities. **Polymers**, [S. l.], v. 13, n. 15, p. 2506, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13152506>
- MARINI, Bernard L. *et al.* Catalyzing improvements in ALL therapy with asparaginase. **Blood Reviews**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 328–338, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.06.002>
- MATHIEU, Chantal; MARTENS, Pieter-Jan; VANGOITSENHOVEN, Roman. One hundred years of insulin therapy. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 0123456789, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00542-w>

MELANDER, Margareta *et al.* Pea lectin expressed transgenically in oilseed rape reduces growth rate of pollen beetle larvae. **Transgenic Research**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 555–567, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1025813526283>. Acesso em: 29 ago. 2021.

MICHELI, Laura *et al.* Phaseolus vulgaris L. Extract: Alpha-amylase inhibition against metabolic syndrome in mice. **Nutrients**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1778, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11081778>. Acesso em: 28 ago. 2021.

MOHAMED, Saleh A. *et al.* Purification and Characterization of Asparaginase from Phaseolus vulgaris Seeds. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2015, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/309214>

MOHAMED, Saleh A. *et al.* L-asparaginase isolated from Phaseolus vulgaris seeds exhibited potent anti-acute lymphoblastic leukemia effects in-vitro and low immunogenic properties in-vivo. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph13101008>

MORENO, Joaquin; ALTABELLA, Teresa; CHRISPEELS, Maarten J. Characterization of α -amylase-inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of Phaseolus vulgaris. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 703–709, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.92.3.703>

MOTA DA SILVA, Aurenice Maria; SOUZA ALMEIDA, Flávia; KAWAZOE SATO, Ana Carla. Functional characterization of commercial plant proteins and their application on stabilization of emulsions. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 292, n. February 2020, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110277>

MUNIER-JOLAIN, Nathalie; LARMURE, Annabelle; SALON, Christophe. Determinism of carbon and nitrogen reserve accumulation in legume seeds. **Comptes Rendus - Biologies**, [S. l.], v. 331, n. 10, p. 780–787, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.020>

MUSIDLAK, Oskar; NAWROT, Robert; GOŹDZICKA-JÓZEPIAK, Anna. Which plant proteins are involved in antiviral defense? Review on in vivo and in vitro activities of selected plant proteins against viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18112300>

NAGAE, Masamichi *et al.* Phytohemagglutinin from Phaseolus vulgaris (PHA-E) displays a novel glycan recognition mode using a common legume lectin fold. **Glycobiology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 368–378, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu004>

NAING, Aung Htay; KIM, Chang Kil. A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering. **3 Biotech**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1861-y>

NAKAGUCHI, Takeshi *et al.* Structural characterization of an α -amylase inhibitor from a wild common bean (Phaseolus vulgaris): Insight into the common structural features of leguminous α -amylase inhibitors. **Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 121, n. 2, p. 350–354, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021594>

NISHIKATA, Makoto. Trypsin-Like Protease from Soybean Seeds. Purification and Some Properties. **The Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 95, n. 4, p. 1169–1177, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A134706>. Acesso em: 28 ago. 2021.

OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Purification of a lectin from Eugenia uniflora L. seeds and its

- potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 371–376, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02319.x>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- OWUSU-ANSAH, Y. J.; MC CURDY, S. M. Pea proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. **Food Reviews International**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 103–134, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129109540903>
- PAAREN, Herbert E. *et al.* Purification of a seed glycoprotein: N-terminal and deglycosylation analysis of phaseolin. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 335–343, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81410-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81410-7)
- PACHECO, Juliana da Silva; SILVA-LOPEZ, Raquel Elisa da. Study of the Proteolytic Activity of the Tropical Legume *Crotalaria spectabilis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, [S. l.], v. 67, n. 9–10, p. 495–509, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/ZNC-2012-9-1008>. Acesso em: 28 ago. 2021.
- PAREDES-LÓPEZ, O. *et al.* Comparison of procedures to determine protein content of developing bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). **Plant Foods for Human Nutrition**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 137–148, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01091893>
- PASTORCORRALES, Marcial *et al.* Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectr... Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Journal of Basic & Applied Sciences**, [S. l.], n. 9, p. 424–437, 2013.
- PEDRAZZINI, Emanuela *et al.* Protein quality control along the route to the plant vacuole. **Plant Cell**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 1869–1880, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.9.10.1869>
- PRAXEDES-GARCIA, Priscila *et al.* Biochemical aspects of a serine protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds: A potential tool to access the mobilization of seed storage proteins. **The Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2012, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1100/2012/562715>
- QL, Jiang *et al.* Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell proliferation**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 17–28, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/CPR.12155>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- REZENDE, Amanda Alves *et al.* Nutritional and protein quality of dry brazilian beans (*Phaseolus vulgaris* l.). **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 421–427, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-457x.05917>
- RIBEIRO, Horaci Jaqueline Silva de Souza *et al.* Caracterização de concentrado proteico de feijão comum preto, cultivar Iapar 44, novo e envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 571–580, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0101-20612009000300019>
- SALZER, Wanda; SEIBEL, Nita; SMITH, Malcolm. Erwinia asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Expert Opinion on Biological Therapy**, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 1407–1414, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.718327>
- SANTORO, Luiz G.; GRANT, George; PUSZTAI, Arpad. In vivo degradation and stimulating effect of phaseolin on nitrogen secretion in rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 223–236, 1999. Disponível em:

<https://doi.org/10.1023/A:1008025922615>

SHARIF, Hafiz Rizwan *et al.* Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants – A review. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 76, p. 2–16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.002>

SHEA, Joan Emma; BROOKS, Charles L. From folding theories to folding proteins: A review and assessment of simulation studies of protein folding and unfolding. **Annual Review of Physical Chemistry**, [S. l.], v. 52, p. 499–535, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.52.1.499>

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, USA, v. 1, n. 6, p. 2857–2860, 2006.

SHI, Kexin *et al.* Effects of anabaena lipoxygenase on whole wheat dough properties and bread quality. **Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 5434–5442, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1782>

SICILIA, Francesca *et al.* Characterization of a membrane-associated apoplatic lipoxygenase in *Phaseolus vulgaris* L. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1748, n. 1, p. 9–19, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.11.022>

SILVA, Helton C. *et al.* BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 49, n. 2, p. 203–209, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2013.10.020>

SLIGHTOM, Jerry L. *et al.* Nucleotide sequences from pbaseolln cDNA clones: the major storage proteins from *Phaseolus vulgaris* are encoded by two unique gene families. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 13, n. 18, p. 6483–6498, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NAR/13.18.6483>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SMOLIKOVA, Galina *et al.* Bringing new methods to the seed proteomics platform: Challenges and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 23, p. 1–54, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21239162>

SODEK, Ladaslav; LEA, Peter J.; MIFLIN, Benjamin J. Distribution and Properties of a Potassium-dependent Asparaginase Isolated from Developing Seeds of *Pisum sativum* and Other Plants. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 22–26, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.65.1.22>

STAUDER, H.; KREUSER, E. D. Mistletoe Extracts Standardised in terms of Mistletoe Lectins (ML I) in Oncology: Current State of Clinical Research. **Oncology Research and Treatment**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 374–380, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000066058>. Acesso em: 29 ago. 2021.

SUN, S. M. *et al.* Reversible and irreversible dissociation of globulins from *Phaseolus vulgaris* seed. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 249, n. 7, p. 2118–2121, 1974. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42805-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42805-6)

TANG, Chuan He. Nanostructured soy proteins: Fabrication and applications as delivery systems for bioactives (a review). **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 91, n. December 2018, p. 92–116, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.012>

VIMAL, Archana; KUMAR, Awanish. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 40–61, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1357294>

- WANG, Wenbo *et al.* Lentil lectin derived from *Lens culinaris* exhibit broad antiviral activities against SARS-CoV-2 variants . **Emerging Microbes & Infections**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1519–1529, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1957720>
- WARSAME, Ahmed O. *et al.* Identification and Quantification of Major Faba Bean Seed Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 68, n. 32, p. 8535–8544, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02927>
- WARSAME, Ahmed O.; O’SULLIVAN, Donal M.; TOSI, Paola. Seed Storage Proteins of Faba Bean (*Vicia faba* L): Current Status and Prospects for Genetic Improvement. review-article. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 66, n. 48, p. 12617–12626, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04992>
- WILSON, Karl A.; TAN-WILSON, Anna L. Characterization of the Proteinase that Initiates the Degradation of the Trypsin Inhibitor in Germinating Mung Beans (*Vigna radiata*). **Plant Physiology**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 93–98, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/PP.84.1.93>. Acesso em: 28 ago. 2021.
- WORKU, Anteneh; SAHU, Omprakash. Significance of fermentation process on biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* (red beans). **Biotechnology Reports**, [S. l.], v. 16, n. October, p. 5–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.09.001>
- YAMAGUCHI, Haruki. Isolation and characterization of the subunits of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor. **Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 110, n. 5, p. 785–789, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123660>