

**AVALIAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DE
GENÓTIPOS DE FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. WALP)
SUSCETÍVEL E RESISTENTE AO *Callosobruchus maculatus*
(FABR. 1775).**

SILVIA MARIA ALVES DE PAULA

FORTALEZA-CEARÁ

2008

**AVALIAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR DE
GENÓTIPOS DE FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. WALP)
SUSCETÍVEL E RESISTENTE *Callosobruchus maculatus*
(FABR. 1775)".**

SILVIA MARIA ALVES DE PAULA

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
BIOQUÍMICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA-CE

JUNHO-2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

P349a Paula, Silvia Maria Alves de.

Avaliação da biossegurança alimentar de genótipos de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. WALP) suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus* (FABR. 1775) / Silvia Maria Alves de Paula. – 2008.

162 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2008.

Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

1. *Callosobruchus maculatus*. 2. Feijão-caupi. 3. Biossegurança alimentar. 4. Gorgulho do feijão-de-corda. I. Título.

CDD 572

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Silvia Maria Alves de

Paula

TESE APROVADA EM: _____

Dra. Ana de Fátima F. U. Carvalho
Universidade Federal do Ceará
Depto. de Biologia

Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará
Depto. de Biologia

Dr. Maurício Pereira de Sales
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte
Depto. de Bioquímica

Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio
Norte

Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Orientadora
Universidade Federal do Ceará
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as coisas que têm realizado em minha vida.

À Profa. Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, pela orientação, dedicação e paciência durante todos esses anos, meu sincero agradecimento.

À Profa. Dra. **Fernanda Maria Machado Maia** por sua amizade, carinho e orientação durante todos esses anos.

À Profa. Dra. **Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho** por tão gentilmente ter cedido seu laboratório para os ensaios biológicos realizados neste trabalho e por suas sugestões.

Ao Prof. Dr. **Thalles Barbosa Grangeiro** por suas valiosas sugestões e por ter colaborado desde os primeiros momentos, com idéias, concessão de dados e tudo mais que lhe foi solicitado.

Ao Prof. Dr. **Maurício Pereira de Sales** pela amizade, sugestões e por aceitar fazer parte desta banca examinadora.

Ao Dr. **Francisco Rodrigues Freire Filho** por ter cedido às sementes utilizadas no presente trabalho e tão prontamente se dispor em fazer parte desta banca examinadora.

Ao Prof. **José Tadeu Abreu de Oliveira** por sua colaboração e amizade.

À Profa. Dra. **Gerly Anne de Castro Brito** por ter cedido o Laboratório de Morfologia para a confecção das lâminas.

Ao Prof. Dr. **Cláudio Cabral Campello** pela ajuda nas análises estatísticas, principalmente pela paciência e disponibilidade.

À Profa. Dra. **Maria Socorro de Sousa Carneiro**, do Departamento de Zootecnia, do Centro de Ciências Agrárias da UFC, por seu incentivo e carinho.

À Profa. Dra. **Érica Freitas Mota** e **Neuza Gomes** pela ajuda e cooperação na realização do ensaio de alergenicidade, muito obrigada.

Ao **José Ivan Rodrigues de Sousa** técnico do Departamento de Histologia da Universidade Federal do Ceará que confeccionou as lâminas.

As minhas amigas do Laboratório de Nutrição Animal, do Centro de Ciências Agrárias da UFC, **Roseane Sousa** e **Helena Oliveira**, pelo apoio nas análises realizadas.

Agradeço, de modo especial, aos meus amigos de laboratório **Adelina Braga, Andréa Agaciana, Daniele Oliveira, Geórgia Sampaio, Hellen Paula, Hemógenes David, Henrique Pinho, Isabel Brasil, Janne Keila, Juliana Gifoni e Mirella Pereira**, por todos esses anos de carinho, amizade e cumplicidade, meu mais sincero obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, **Bethânia Andrade, Edvar Monteiro. Hélio de Araújo, Hévila Salles, Darcy Mayra e Simone Martins.**

7

A todos os **Professores** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, agradeço pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos **Funcionários** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

As minhas amigas **Cristina Paiva, Estela Maria, Helda Lenz, Janáina Moraes, Magnely Moura, Raquel Miranda, e Vivianne Duarte** por essa amizade que me faz ter força de continuar em frente, amo vocês.

A minha amiga **Juçara Maria Romão** por seu carinho, e por ajudar nas pesquisas e digitação desta tese, minha amizade incondicional.

A todos meus **Amigos e Amigas** que sempre estiveram comigo, e que mesmo sem citá-los um por um estão todos guardados dentro do meu coração.

A minha irmã **Maria Ivanda de Paula**, por todo o apoio a mim dedicado todos esses anos, pela ajuda financeira e emocional nos momentos mais difíceis, e por ser meu maior exemplo.

Aos meus sobrinhos **Ana Clara Nazaré e Filipe Nazaré**, pelos finais de semana “perdidos” nos laboratórios da bioquímica.

Aos meus pais, **Clóvis de Paula (*in memoriam*) e Teresa de Paula**, por tudo que sou e que conquistei na minha vida.

Por fim, a toda **minha família** por ser o melhor de mim, amo todos vocês.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa: “Bioprospecção da Caatinga Cearense com Potencial Nutricional, Bioinseticida, Biofungicida e Bionematicida” e pela bolsa de Pós-graduação concedida à autora desta tese.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa: “Peptídeos/Proteínas Presentes em Plantas Nativas e Cultivadas do Nordeste Brasileiro com Potencial Biotecnológico no Controle de Pragas e Doenças Agrícolas”.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa: “Proteínas de Sementes: Aspectos Estruturais, Funcionais e Potencial Biotecnológico” (PROCAD).

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio Norte, pela concessão dos genótipos de feijão-de-corda utilizados no presente trabalho.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foram desenvolvidos os experimentos necessários à realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	13
<u>LISTA DE TABELAS</u>	18
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	21
<u>RESUMO</u>	22
<u>ABSTRACT</u>	24
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	26
<u>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</u>	31
2.1. <u>Feijão Caupi – Produção e Valor Nutricional</u>	32
2.2. <u>Fatores Bióticos Limitantes da Produção do Feijão Caupi</u>	34
2.2.1. <i>Callosobruchus maculatus</i> – Uma Praga de Armazenamento do Feijão Caupi	35
2.2.2. Resistência do Feijão Caupi ao <i>Callosobruchus maculatus</i>	38
2.3. <u>Feijão Caupi – Uma Fonte de Proteínas com Propriedades Diversas</u>	39
2.3.1. Proteínas de Reserva do Feijão Caupi – Globulinas	40
2.3.2. Proteínas de Feijão Caupi que Limitam a sua Utilização e Valor Nutricional	41
2.4. <u>Melhoramento Genético e Biossegurança Alimentar</u>	43
2.4.1. Biossegurança Alimentar	44
2.4.2. Avaliação Qualitativa dos Alimentos	46
<u>3. OBJETIVOS</u>	51
3.1. <u>Gerais</u>	52
3.2. <u>Específicos</u>	52

4. <u>MATERIAIS</u>	54
4.1. <u>Sementes</u>	55
4.2. <u>Hemácias</u> .	55
4.3. <u>Animais</u>	55
4.4. <u>Reagentes Químicos</u>	56
5. <u>MÉTODOS</u>	57
5.1. <u>Preparação da Farinha de Cotelédones</u>	58
5.2. <u>Composição Centesimal</u>	58
5.2.1. Determinação do Teor de Umidade	58
5.2.2. Determinação do Teor de Cinzas	58
5.2.3. Determinação do Teor de Proteína Total	59
5.2.4. Determinação do Teor de Lipídios	59
5.2.5. Determinação dos Teores de Fibra Bruta	60
5.3. <u>Caracterização das Proteínas das Sementes</u>	61
5.3.1. Extração das Proteínas Solúveis	61
5.3.2. Dosagem de Proteínas	61
5.3.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes	62
5.4. <u>Deteccção e Dosagem de Proteínas com Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas</u>	63
5.4.1. Lectina	63
5.4.2. Inibidor de Tripsina	64
5.4.3. Uréase	64
5.5. Purificação das Proteínas Ligantes à Quitina (PLQ)	65
5.6. Avaliação da Digestibilidade <i>In vitro</i> das PLQ	67

5.6.1. Ação individual da pepsina, tripsina, quimiotripsina e papaína sobre as PLQ	67
5.6.2. Ação Seqüencial da Pepsina, Tripsina e Quimiotripsina	68
5.7. <u>Ensaio Biológicos</u>	68
5.7.1. Ensaio Biológico I - Avaliação da Qualidade Nutricional das Proteínas de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho)	69
5.7.1.1. Dietas.	69
5.7.1.2. Animais	71
5.7.1.3. Experimento	71
5.7.1.4. Determinação dos Parâmetros Nutricionais	72
5.7.2. Ensaio Biológico II - Avaliação das Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas das Proteínas Ligantes à Quitina de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho)	73
5.7.2.1. Dietas	73
5.7.2.2. Análise Histológica e Morfométrica	75
5.7.3. Ensaio Biológico III - Avaliação da Alergenicidade das Proteínas de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho)	76
5.7.3.1. Imunização por Via Oral e Coleta de Soro	76
5.7.3.2. Análise Sorológica por Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)	77
6. <u>RESULTADOS</u>	78
6.1. <u>Parte 1</u>	80
6.1.1. <u>Composição Centesimal</u>	80

6.1.2. <u>Comparação dos Perfis Protéicos das Farinhas de Sementes dos Genótipos de Feijão Caupi por PAGE-SDS</u>	80
6.1.3. <u>Deteccção e Dosagem de Proteínas com Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas</u>	82
6.1.3.1. Lectina	82
6.1.3.2. Inibidor de Tripsina	82
6.1.3.3. Uréase	85
6.1.4. <u>Ensaio Biológico I - Avaliação da Qualidade Nutricional das Proteínas de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho)</u>	85
6.1.4.1. Curvas de Crescimento, Dieta Ingerida e Ganho ou Perda de Peso Corpóreo	85
6.1.4.2. Balanço de Nitrogênio	87
6.1.4.3. Parâmetros Nutricionais	92
6.1.4.4. Alterações Macroscópicas nos Órgãos dos Ratos	92
6.2. <u>Parte 2</u>	97
6.2.1. <u>Obtenção das Proteínas Ligantes à Quitina</u>	97
6.2.2. <u>Avaliação da Digestibilidade <i>In vitro</i> das PLQ</u>	97
6.2.3. <u>Ensaio Biológico II - Avaliação das Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas das Proteínas Ligantes à Quitina (PLQ) de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho)</u>	106
6.2.3.1. Curvas de Crescimento, Dieta Ingerida e Ganho ou Perda de Peso Corpóreo	106
6.2.3.2. Balanço de Nitrogênio	109
6.2.3.3. Parâmetros Nutricionais	112

6.2.3.4. Alterações Macroscópicas nos Órgãos dos Ratos	114
6.2.3.5. Análises Histológicas e Morfométricas	114
6.2.4. <u>Ensaio Biológico III - Avaliação da Alergenicidade das Proteínas de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho)</u>	119
7. <u>DISCUSSÃO</u>	126
8. <u>CONCLUSÕES</u>	140
9. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	142

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 - Parâmetros utilizados para classificação dos genótipos BR9 Longá e IT81D 1053 de feijão caupi como suscetível e resistente respectivamente, ao *Callosobruchus maculatus*
- 2 - Planta de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers]
- 3 - Esquema do ciclo fenológico do caupi com a ocorrência das principais pragas
- 4 - Adulto de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) em grãos apresentando ovos e orifício de saída dos insetos
- 5 - Esquema de obtenção das proteínas ligantes à quitina a partir do extrato bruto preparado de farinhas das sementes de genótipos de feijão caupi suscetível (BR9 Longá) e resistente (IT81D 1053) ao *C. maculatus*
- 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol da farinha (80 μ gP) de sementes de feijão caupi, genótipos IT81D 1053 e BR9 Longá, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente. (1) Marcadores de massa molecular; (2) farinha de IT81D 1053 e (3) farinha de BR9 Longá
- 7 - Curvas de crescimento dos ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparadas com as curvas de crescimento dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo e dieta isenta de proteínas

- 8 - Curvas de consumo diário dos ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparadas com as curvas de consumo dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo e dieta isenta de proteínas
- 9 - Cromatografia de afinidade em coluna de quitina. Extrato bruto (250 mgP) do genótipo suscetível (BR9 Longá) foi aplicado em coluna de quitina (27,1 x 3,1 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5. As proteínas foram eluídas com ácido acético 0,2 M. Fluxo da coluna: 100 mL/h; Fração: 5 mL/tubo. Proteína retida: 0,87 mg
- 10 - Cromatografia de afinidade em coluna de quitina. Extrato bruto (250 mgP) do genótipo resistente (IT81D 1053) foi aplicado em coluna de quitina (27,1 x 3,1 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5. As proteínas foram eluídas com ácido acético 0,2 M. Fluxo da coluna: 100 mL/h; Fração: 5 mL/tubo. Proteína retida: 0,98 mg
- 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol da farinha (80 μ gP) de sementes de feijão caupi, genótipos IT81D 1053 e BR9 Longá, suscetível e resistente ao *C. maculatus*, respectivamente
- 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina, BSA (controle) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo BR9 Longá (PLQ suscetível), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro*, com pepsina, tripsina, quimiotripsina e papaína nos períodos de tempo: 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas

- 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina, BSA (controle) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo IT81D 1053 (PLQ resistente), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro* com pepsina, tripsina, quimiotripsina e papaína nos seguintes períodos de tempo: 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas
- 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina (BSA) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo BR9 Longá (PLQ suscetível), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro* com pepsina (3 horas), seguida de tripsina e quimiotripsina (2 horas)
- 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina (BSA) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo IT81D 1053 (PLQ resistente), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro* com pepsina (3 horas), seguida de tripsina e quimiotripsina (2 horas)
- 16 - Curvas de crescimento dos ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ), genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparadas com as curvas de crescimento dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo (clara do ovo) e dieta isenta de proteínas (NPC)
- 17 - Curvas de consumo diário dos ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ), genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparadas com as curvas de crescimento dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo (clara do ovo) e dieta isenta de proteínas (NPC)

- 18 - Cortes do duodeno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle)
- 19 - Cortes do jejuno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle)
- 20 - Cortes do duodeno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle)
- 21 - Cortes do jejuno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle)
- 22 - Medidas da altura das vilosidades efetuadas em cortes histológicos de duodeno e jejuno, de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle)

- 23 - Medidas da profundidade das criptas efetuadas em cortes histológicos de duodeno e jejuno, de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle)
- 24 - Medidas da relação vilosidade/cripta efetuadas em cortes histológicos de duodeno e jejuno, de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle)
- 25 - Cinética da síntese de IgE-específica. Camundongos foram imunizados por via oral com diferentes antígenos e a sorologia foi avaliada por anafilaxia cutânea passiva (PCA). A imunização foi feita durante dez dias consecutivos, usando 100 µg de proteína. Antígenos: Ovalbumina (OVA); farinha do genótipo resistente (IT81D 1053); farinha do genótipo suscetível (BR9 Longá); fração ligante à quitina de IT81D 1053 (PLQ Resistente); fração ligante à quitina de BR9 Longá (PLQ Suscetível)

LISTA DE TABELAS

Página

- 1 - Composição (g/Kg) das dietas controle (clara do ovo e aprotéica) e experimentais (farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR 9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente)
- 2 - Composição (g/Kg) das dietas controle (clara do ovo e aprotéica) e experimentais (proteínas ligantes à quitina de sementes dos genótipos BR 9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente)
- 3 - Composição proximal (g/100 g de farinha) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, expressa em percentual de peso seco
- 4 - Proteínas antinutricionais e/ou tóxicas presentes no extrato bruto de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente
- 5 - Ganho ou perda de pesos dos animais alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta isenta de proteínas

- 6 - Balanço de nitrogênio dos ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo, calculados para os últimos cinco dias de experimento
- 7 - Parâmetros nutricionais obtidos pela alimentação de ratos (n = 6) com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo
- 8 - Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) de órgãos tubulares e glândulas anexas do sistema digestório de ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica
- 9 - Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) do coração, rins, pulmões e órgãos linfóides de ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica

- 10 - Ganho ou perda de pesos dos animais alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo e dieta isenta de proteínas
- 11 - Balanço de nitrogênio dos ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo, calculados para os últimos cinco dias de experimento
- 12 - Parâmetros nutricionais obtidos pela alimentação de ratos (n = 4) com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo
- 13 - Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) de órgãos tubulares e glândulas anexas do sistema digestório de ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica
- 14 - Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) do coração, rins, pulmões e órgãos linfóides de ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BAPNA	<i>N</i> - α -L-Benzoil-Arginina- <i>p</i> -Nitroanilida
IgE	Imunoglobulina E
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) – aminometano
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,0
PLQ	Proteínas ligantes à quitina
UH	Unidade de Hemaglutinação. Definida como o inverso da maior diluição que é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%
NPU	Utilização líquida de proteína

RESUMO

O Brasil é um dos grandes produtores de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], uma importante leguminosa para consumo humano por ser boa fonte de proteínas e carboidratos. Todavia, há vários fatores que limitam a produtividade e utilização dessa cultura, destacando-se o ataque pelo inseto *Callosobruchus maculatus* (gorgulho), conhecido como uma das principais pragas de armazenamento. No Nordeste do Brasil, genótipos de feijão caupi foram criados através de melhoramento genético, visando aumento da produtividade e resistência a doenças e pragas. Porém, é detectada a escassez de informações relacionando resistência e valor nutricional. Assim sendo, no presente estudo, dois genótipos melhorados geneticamente, BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao gorgulho, respectivamente, foram selecionados, para verificar se as alterações promovidas pelo melhoramento afetariam sua qualidade nutricional. Os dados de composição centesimal mostraram que ambos os genótipos constituem-se em boa fonte de proteínas (23,45 e 26,61 g/100 g de matéria seca), carboidratos (61,62 e 62,94 g/100 g de matéria seca) e fibra bruta (4,32 e 5,20 g/100 g de matéria seca), apresentando baixos conteúdos de lipídios (3,30 e 3,89 g/100 g de matéria seca). Os perfis eletroforéticos da farinha de sementes dos dois genótipos mostraram-se muito semelhantes entre si, exceto a existência de uma banda mais proeminente na região de 29 kDa verificada no genótipo resistente. Fatores antinutricionais tais como lectina, urease e inibidor de tripsina foram verificados nos dois genótipos de feijão caupi avaliados. Os teores de lectina (0,10 UH/mgF) e de urease (25,13 e 25,41 U/gF) se mostraram bem similares nos genótipos suscetível e resistente. Já os conteúdos de inibidor de tripsina foram diferentes, tendo o genótipo resistente apresentado maior atividade (18,55 mg de tripsina inibida/gF) em comparação ao suscetível (12,57 mg de tripsina inibida/gF). Farinhas dos genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, quando incluídas em dietas para ratos como única fonte protéica, a 10%, não foram capazes de promover o crescimento dos animais de forma similar à albumina da clara do ovo (proteína padrão). Todavia, quando comparado o tratamento

contendo farinha do genótipo suscetível com aquele contendo o genótipo resistente, para a maioria dos parâmetros analisados, as respostas foram bem parecidas. Dietas contendo proteínas ligantes à quitina (PLQ), purificadas do genótipo suscetível e do resistente, complementadas com albumina da clara do ovo, apresentaram valor nutricional igual ou superior ao padrão (somente clara do ovo). Diante dos parâmetros analisados, os resultados permitem concluir que o melhoramento genético do feijão caupi, o qual conferiu resistência ao *Callosobruchus maculatus*, não foi capaz de alterar a qualidade nutricional dessa leguminosa. Além disso, diferentemente ao verificado com o *Callosobruchus maculatus*, não foram observados efeitos antinutricionais, tóxicos e/ou alergênicos para os animais testados (ratos e camundongos), associados ao consumo das PLQ provenientes do genótipo suscetível ou do resistente.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest producers of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], a very important legume for human dietary protein and carbohydrate supply. Nevertheless, there are some factors which limit its productivity and utilization. The insect *Callosobuchus maculatus* (cowpea weevil) is considered the principal pest that attacks stored grains. In the Northeast of Brazil, breeding efforts involving cowpea have been directed towards the selection of high yielding varieties associated with traits of resistance to diseases and pests. However, studies on the nutritional quality of these improved genotypes are scanty. In this study, the research was conducted with two cowpea genotypes, BR9 Longá e IT81D 1053, susceptible and resistant to cowpea weevil, respectively, to evaluate whether the probable factors related to the resistance would interfere with the nutritional value. Proximate composition showed that both genotypes are good sources of proteins (23.45 and 26.61 g/100 g dry matter), carbohydrates (61.62 and 62.94 g/100 g dry matter) and crude fiber (4.32 and 5.20 g/100 g dry matter), presenting low contents of oil (3.30 and 3.89 g/100 g dry matter). Polyacrylamide gel electrophoresis of the seed flours showed similar patterns for both genotypes, except for the presence of a very prominent 29 kDa band in the resistant genotype. The presence of antinutritional factors such as lectin, urease and trypsin inhibitor was detected in both cowpea genotypes. Lectin (0.10 UH/mgF) and urease (25.13 and 25.41 U/gF) amounts were similar in the susceptible and resistant genotypes. The resistant genotype presented a higher content of trypsin inhibitor (18.55 mg trypsin inhibited/gF) than the susceptible one (12.57 mg trypsin inhibited/gF). Feeding trial conducted with rats fed the experimental diets containing seed flour of BR9 Longá and IT81D 1053 as the sole protein source, at 10% level, were not sufficient to promote animal growth compared to the animals fed the high quality diet containing egg white. However, when compared the treatments containing susceptible and resistant cowpea genotypes most of parameters analyzed were similar. Diets containing the chitin binding proteins (CBP), purified from susceptible and resistant cowpea genotypes and complemented

with egg white, showed similar or higher nutritional values as compared with the positive control diet (only egg white). Based on these results, it is possible to conclude that the breeding strategies used to confer resistance to cowpea against *C. maculatus* did not interfere with its nutritional quality. Most importantly and contrary to what was observed for *C. maculatus*, CBP from susceptible or resistant genotype did not provoke antinutritional, toxic and/or allergenic effects on tested animals (rats and mice).

1. INTRODUÇÃO

O feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa comestível dotada de alto conteúdo protéico, com boa capacidade de fixação de nitrogênio, sendo, também, pouco exigente quanto à fertilidade do solo (JÚNIOR *et al.*, 2007). Essa espécie tem como habitat natural regiões de clima quente, estando bem adaptada às condições das Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2007), a produção de feijão caupi no Brasil foi de 3.286,282 t em 2007, com produção estimada de 3.428,101 t para o ano de 2008. No nordeste brasileiro, essa leguminosa recebe atenção diferenciada, consistindo em um dos principais componentes da dieta alimentar do nordestino, se sobressaindo, também, como um importante gerador de emprego e renda.

Apesar da expressiva produção dessa cultura, há vários fatores bióticos e abióticos que impõem restrições ao cultivo e utilização do feijão caupi. Dentre os de natureza biótica, ressaltam-se o ataque de pragas e as doenças (FREIRE-FILHO *et al.*, 1999; CARDOSO *et al.*, 2000). O inseto *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), conhecido como gorgulho do feijão caupi ou simplesmente gorgulho, se destaca como uma das principais pragas dessa cultura, sendo responsável pela quase totalidade das perdas ocorridas nos grãos armazenados, reduzindo seu peso e sua qualidade, bem como o poder germinativo das sementes (FREIRE *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2001).

No combate ao ataque do gorgulho, o uso de genótipos resistentes representa uma prática bastante promissora dada à facilidade de utilização, baixo custo e compatibilidade com outras táticas de controle. A resistência a esse inseto foi, inicialmente, relacionada à presença de inibidores de tripsina (GATEHOUSE *et al.*, 1979). Posteriormente, foi verificado que essa resistência estava associada à ocorrência de vicilinas variantes (MACEDO *et al.*, 1993). Uma das características das vicilinas, tanto das normais como das variantes, é a sua capacidade de interagir com quitina, um homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina presente na membrana peritrófica dos insetos (SALES *et al.*, 1996). Nos genótipos de feijão caupi resistentes ao gorgulho é evidenciada uma associação mais forte das vicilinas variantes com as membranas quitinosas do tubo digestivo (FIRMINO *et al.*, 1996).

Apesar de vários estudos direcionados à resistência do feijão caupi ao gorgulho, com foco nos componentes envolvidos e no mecanismo de ação, há uma lacuna no que diz respeito à comparação do valor nutricional de genótipos suscetíveis e resistentes, sobretudo se considerado a importância alimentar dessa leguminosa para o homem. Nesse contexto, o presente estudo foi desenvolvido buscando responder às seguintes indagações:

1. Sementes de genótipos de feijão caupi suscetível e resistente ao gorgulho diferem entre si em valor nutricional, quando utilizadas como fonte de proteínas em dietas para animais monogástricos (ratos)?
2. Sabendo-se que a metionina é o principal aminoácido limitante no feijão caupi, será que a não suplementação da dieta com esse aminoácido poderia implicar em respostas drásticas, a ponto de mascarar os efeitos deletérios, porventura existentes, provenientes do consumo dos genótipos suscetível ou resistente?
3. Proteínas ligantes à quitina purificadas de sementes de feijão caupi, portanto, compreendendo as vicilinas, teriam efeitos deletérios quando incluídas em dietas para ratos em crescimento, a exemplo do que tem sido verificado com insetos, em particular com o gorgulho do feijão caupi?
4. Haveria diferenças entre as proteínas ligantes à quitina purificadas de um genótipo suscetível e de um resistente ao gorgulho no que se refere aos seus efeitos sobre animais monogástricos?

Essas perguntas foram formuladas no intuito de fornecer subsídios que pudessem auxiliar na decisão de seleção de genótipos de feijão caupi para cultivo comercial, na tentativa de conciliar produção e valor nutricional, em virtude da crescente necessidade de incremento na oferta de alimentos visando o aporte à alimentação do homem.

Como genótipos suscetível e resistente ao gorgulho foram escolhidos BR9 Longá e IT81D 1053, respectivamente. Essa escolha foi realizada com base em dados obtidos por Freire (2002), no trabalho intitulado “Genótipos de

feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] melhorados geneticamente: caracterização em relação ao ataque pelo *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1792) “, cujos dados estão apresentados resumidamente na FIGURA 1.

Para situar melhor o trabalho aqui apresentado, no contexto da busca por genótipos mais produtivos de feijão caupi e de elevada qualidade nutricional, inicialmente serão abordados aspectos relacionados à importância econômica e nutricional dessa leguminosa. Em seguida, será feita uma breve revisão sobre os fatores bióticos que limitam a produção e inviabilizam a utilização do feijão caupi, dando destaque ao ataque do gorgulho, e quais as principais medidas de controle utilizadas. Nessa abordagem será enfatizado o papel das proteínas ligantes à quitina na resistência ao gorgulho. Posteriormente, será ressaltada a importância de realizar ensaios voltados para avaliação da qualidade nutricional, com ênfase na biossegurança alimentar, de fontes alimentícias usadas pelo homem que se tornaram resistentes a determinada praga ou patógeno, seja através do melhoramento genético convencional, seja pelo uso da engenharia genética.

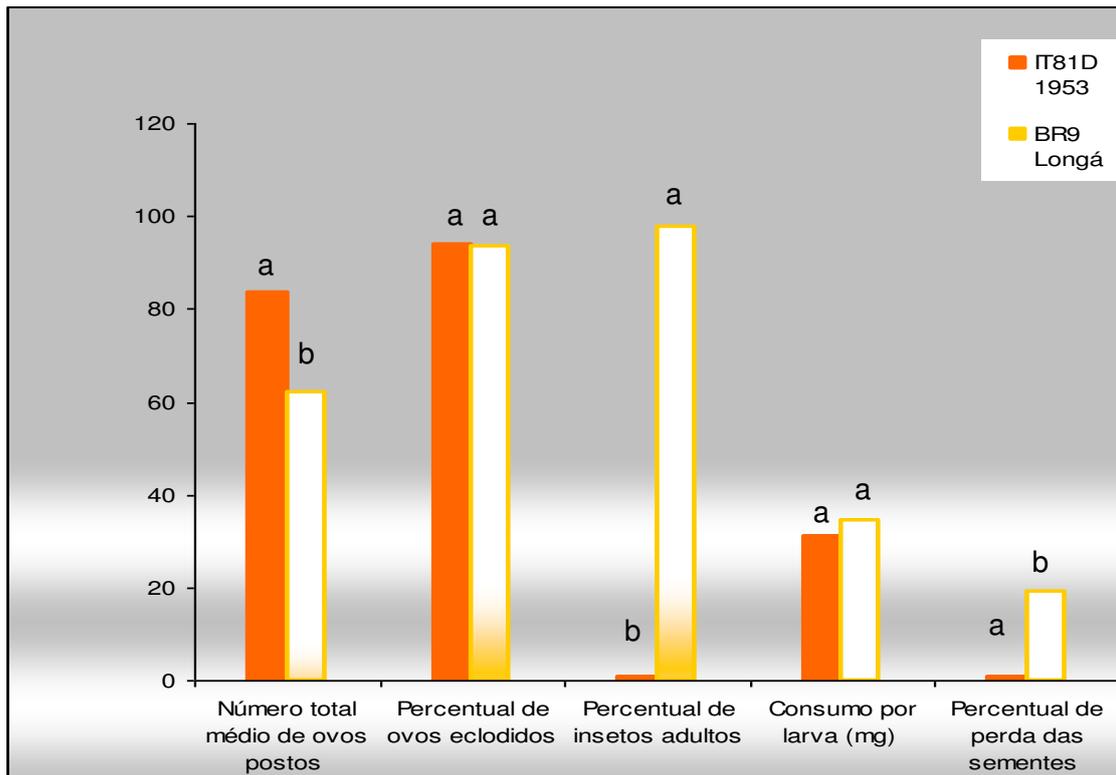


FIGURA 1. Parâmetros utilizados para classificação dos genótipos BR9 Longá e IT81D 1053 de feijão caupi como suscetível e resistente respectivamente, ao *Callosobruchus maculatus*. Os dados apresentados nessa figura foram provenientes do trabalho desenvolvido por Freire (2002).

2. FUNDAMENTAÇÃO

TEÓRICA

2.1. Feijão Caupi – Produção e Valor Nutricional

O feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa dicotiledônea, pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, seção *Catiang* (NG, 1990) (FIGURA 2).

Essa leguminosa é cultivada em grandes extensões nas regiões tropicais e, mais particularmente, nas zonas semi-áridas e sub-úmidas dos continentes africano, asiático e americano (OLIVEIRA *et al.*, 2003; RANGEL *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2004; DUTRA *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2007). Mais de 70% de sua produção mundial estão concentradas em três países: Nigéria se destacando com 5 milhões de hectares; Niger com 3 milhões de hectares e o Brasil com 1,9 milhões de hectares (PHILLIPS, *et al.*, 2003; SING *et al.*, 2003; EMBRAPA, 2007).

No Brasil, o feijão caupi tem extrema importância econômica e social. Na safra de 2003 – 04, por exemplo, ele representou o quinto grânifero mais produzido, perdendo apenas para soja, milho, arroz e trigo (FUSCALDI *et al.*, 2005). Considerando o quadro da produção agrícola nordestina, devido principalmente à falta de chuva na região e escassez de recursos, o feijão caupi possui relevância no suprimento alimentar e na economia da região por suas características peculiares, compreendendo ciclo curto, maior tolerância ao estresse hídrico do que outras culturas, boa capacidade de fixação de nitrogênio e, ainda, baixa exigência quanto à fertilidade do solo (JUNIOR *et al.*, 2007). Seu cultivo é baseado em padrões tradicionais, sendo feito tanto por pequenos, como por médios e grandes produtores (<http://www.acessepiaui.com.br/geral2.id=52012&ref=200605>). Todos os estados da região Nordeste cultivam o feijão caupi, principalmente o Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão, Paraíba e Pernambuco (PAIVA *et al.*, 1977; CARDOSO, 2000; COSTA *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2007), sendo responsáveis por 40% da produção nacional de feijão, incluindo o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*).



FIGURA 2. Planta de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers]. Fonte: http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.vice.pi.gov.br/noticias/fotos/200504/CCOM22_dcab99ff94.JPG&imgrefurl=http://www.vice.pi.gov.br/materia.php%3Fid%3D21943&h=263&w=350&sz=27&hl=pt-BR&start=2&usg=__FAOojTAheaTsDRkiWd-YYm4peRQ=&tbnid=dugtFJ9njJFJCM:&tbnh=90&tbnw=120&prev=/images%3Fq%3Dcaupi%26gbv%3D2%26hl%3Dpt-BR%26sa%3DG

Do ponto de vista nutricional, a semente do feijão caupi é um importante e tradicional produto na alimentação da população mundial, sendo considerada uma das leguminosas mais consumidas pelo homem (GRANITO *et al.*, 2005; MOECHEM *et al.*, 2006). No Brasil e em outros países da América Latina, o caupi é um dos alimentos básicos mais consumidos e uma fonte de proteínas, vitaminas e minerais de fácil acesso (MOSCHEM *et al.*, 2006). No Nordeste e Norte do país, o feijão caupi faz parte da alimentação e do contexto sócio-econômico das famílias, sendo considerado gênero de primeira necessidade para essas populações (DUTRA *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2007; <http://www.acessepiaui.com.br/geral2.phpid=52012&ref=200605>).

Na composição do feijão caupi são encontrados proteínas (20 - 30 %), carboidratos (50 - 63%), vitaminas e fibras alimentares (ONWULIRI *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2003; RIVAS-VEJA *et al.*, 2006; KAPTISO *et al.*, 2008). O teor de lipídios (0,93 a 1,65 %) é baixo, constituído em torno de 66% por ácidos graxos insaturados. De modo geral, o feijão caupi apresenta um bom balanceamento de aminoácidos essenciais, embora seja deficiente em aminoácidos sulfurados (HOSSAIN e BECKER, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2003). Entre os micronutrientes mais importantes presentes nos grãos de feijão caupi sobressaem-se ferro e zinco (<http://www.saboreseletras.com.br/2008/internas/noticias.aspxidmateria=518>). Em comparação com outras leguminosas de mesma importância econômica, o caupi contém baixo teor de fatores antinutricionais (MAIA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

2.2. Fatores Bióticos Limitantes da Produção do Feijão Caupi

As doenças são responsáveis por expressivas perdas sofridas pelo feijão caupi no processo de produção e na qualidade nutricional, representando um fator limitante do cultivo racional dessa cultura. O feijão caupi está sujeito a doenças causadas por diferentes agentes patogênicos tais como, fungos,

bactérias e vírus (GOMES *et al.*, 2004). Essas perdas podem ser maiores ou menores, de acordo com fatores ambientais e climáticos (LIMA *et al.*, 2001).

Além dos patógenos, ressaltam-se as pragas como causadores de grandes perdas na cultura de feijão caupi, cujos exemplos são os fitonematóides e insetos (CARDOSO, 2000). Em relação aos insetos, de uma maneira geral, a sua ocorrência no feijão caupi é dada em uma determinada época, relacionada com a produção de seu alimento ideal. A FIGURA 3 mostra a distribuição das pragas de feijão caupi de acordo com a fenologia da planta.

2.2.1. *Callosobruchus maculatus* – Uma Praga de Armazenamento do Feijão Caupi

Dentre os insetos, destaca-se o bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (Fabr. 1972), que é uma importante praga de pós-colheita, sendo responsável pela quase totalidade das perdas ocorridas nos grãos armazenados (FIGURA 4). Devido ao seu potencial depreciativo e sua ocorrência mundial, é considerado como a principal praga do feijão caupi (LIMA *et al.*, 2001; MOECHEM *et al.*, 2006). A infestação é iniciada nas vagens ainda no campo. Logo que as vagens amadurecem, é intensificada a infestação no armazém, principalmente quando a temperatura e a umidade relativa são favoráveis. O inseto é prejudicial não somente pela redução do peso das sementes, mas também pela redução do valor nutritivo, pela queda do poder germinativo da semente e por abrir caminho para o ataque por fungos (FREIRE-FILHO *et al.*, 1999; BARRETO *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2001; MURAD *et al.*, 2007).

Os principais métodos de controle de doenças e pragas de feijão caupi envolvem o uso de agrotóxicos e/ou o cultivo de variedades resistentes. Os métodos convencionais de controle ao *Callosobruchus maculatus* com inseticidas orgânicos sintéticos, visando à conservação de sementes de feijão caupi, têm apresentado resultados não satisfatórios, quando ao controle do referido inseto.

Paquinha	Paquinha, Lagarta elasmó, Lagarta-rosca, Larvas de vaquinhas, Vaquinhas, Lagartas desfolhadoras, Cigarrinha, Pulgão, Mosca-branca, Minador-das-folhas	Vaquinhas, Pulgão, Lagartas desfolhadoras, Lagartas das vagens, Mosca-branca, Minador-das-folhas, Percevejo, Manhoso	Percevejos, Manhoso, Pragas dos grãos armazenados
0	Día		55
5	35		80
Germinação	Florescimento		Maturação/colheita
	Fase vegetativa	Fase reprodutiva	

FIGURA 3. Esquema do ciclo fenológico do feijão caupi com a ocorrência das principais pragas. Fonte:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/pragas.htm>



FIGURA 4. Adulto de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) em grãos apresentando ovos e orifício de saída dos insetos. Fonte: <http://www.springhalen.dk/snudebiller.JPG>

Em outros casos, além do custo, a desvantagem da aplicação desses produtos é relacionada com a viabilidade germinativa das sementes ou com a presença de resíduos tóxicos prejudiciais ao consumo do grão. Diante desse fato, o uso de cultivares resistentes constitui uma alternativa promissora com o real objetivo de reduzir os danos e as perdas no armazenamento. A identificação de fontes de resistência em feijão caupi, bem como de seus compostos de defesa, constitui importante ferramenta no melhoramento genético, sendo uma das táticas mais promissoras no manejo de *Callosobruchus maculatus*, pela facilidade de utilização, baixo custo e compatibilidade com outras medidas de controle (LIMA *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2004).

2.2.2. Resistência do feijão caupi ao *Callosobruchus maculatus*

Muitos estudos foram conduzidos até a conclusão dos componentes envolvidos na resistência do feijão caupi ao *Callosobruchus maculatus*. A princípio, essa resistência foi atribuída aos altos níveis de inibidores de tripsina encontrados em alguns cultivares, como exemplo TVu 2027, considerados suficientes para inibir toda tripsina do tubo digestivo do inseto (GATEHOUSE, 1979). Contrariando esse achado, foi observada a existência de genótipos suscetíveis com os mesmos níveis de inibidores encontrados em genótipos resistentes, tornando claro que os inibidores de tripsina não tinham muito a ver com a resistência. Corroborando com isso, foi mostrada a presença de proteases ácidas (aspárticas e cisteínicas) no tubo digestivo de *Callosobruchus maculatus* e não de proteases alcalinas (XAVIER-FILHO e COELHO, 1980; XAVIER-FILHO *et al.*, 1989). Esses dados evidenciavam, portanto, a não participação dos inibidores de tripsina na resistência ao gorgulho.

Diante da constatação de que *Callosobruchus maculatus* utiliza proteinases cisteínicas para digestão de proteínas da dieta, foi sugerida a participação de inibidores dessas enzimas nos mecanismos de resistência. Todavia, anos mais tarde foi mostrado que os inibidores de papaína não estavam envolvidos com a resistência ao gorgulho (FERNANDES *et al.*, 1993).

Experimentos posteriores empregando o fracionamento da semente e a reconstituição de “uma semente” com todas as frações mostraram que o fator ou fatores da resistência co-precipitavam com as globulinas (vicilinas). Em seguida, foi verificado que a resistência estava associada à existência de vicilinas variantes (MACEDO *et al.*, 1993).

Uma das características das vicilinas, tanto das normais como das variantes, é a sua capacidade de interagir com quitina, um homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina presente na membrana peritrófica dos insetos, na parede celular de algas verdes e fungos, no exoesqueleto de muitos crustáceos e nos ovos e na cutícula dos nematóides (SALES *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1997; SELITRENNIKOFF *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2002; TEXEIRA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007). Dados mais recentes mostram a capacidade de interação das vicilinas de feijão caupi com a quitina, propriedade esta diretamente relacionada com a defesa das plantas contra insetos (SALES *et al.*, 2001). Nos genótipos de feijão caupi que são resistentes ao gorgulho é verificada uma associação mais forte das vicilinas variantes com as membranas quitinosas do tubo digestivo (FIRMINO *et al.*, 1996). Essa interação pode ser confirmada pelo uso de anticorpos anti-quitina (SALES *et al.*, 2001).

2.3. Caupi – Uma Fonte de Proteínas com Propriedades Diversas

Dado ao elevado teor de proteínas presente nas sementes de feijão caupi é previsível que essas macromoléculas apresentem características e propriedades distintas. Nesse trabalho, será dada ênfase às proteínas relacionadas com a função de reserva e as que limitam a utilização de nutrientes.

2.3.1 - Proteínas de Reserva do Feijão Caupi – Globulinas

Proteínas presentes em sementes de leguminosas são classificadas em dois grupos principais: globulinas ou proteínas solúveis em sal e albuminas ou proteínas solúveis em água (VIOQUE *et al.*, 1999). As globulinas representam cerca de 70% das proteínas de leguminosas, podendo ser divididas, principalmente, em leguminas e vicilinas, sendo essas classificadas pelo seu respectivo coeficiente de sedimentação 11S ou 7S, respectivamente. A função das globulinas como proteínas de reserva da semente é a de fornecimento de energia, carbono e redução de nitrogênio para a germinação e crescimento do vegetal (CASEY *et al.*, 1986).

As proteínas 7S são oligoméricas com pH e força iônica dependentes do equilíbrio entre associação e dissociação (SCHOLZ *et al.*, 1983). As estruturas tridimensionais dessas proteínas têm sido determinadas, servindo de poderosas ferramentas para o maior conhecimento da relação estrutura *versus* função. As proteínas 7S com estruturas mais conhecidas são provenientes de *Phaseolus vulgaris* (DYER *et al.*, 1993). Em relação às proteínas 11S, essas são, também, oligoméricas, usualmente hexâmeros. Entretanto, esses se mostraram menos susceptíveis à dissociação, exceto pela força iônica e pH baixos (KOSHIYAMA, 1983).

Frações tipo vicilinas ou 7S (G-1), chamadas vigninas, representam globulinas heterogêneas com elevada massa molecular (170 kDa), formada de três subunidades similares (40-70 kDa) ligadas por pontes dissulfetos (CASEY *et al.*, 1986). Essas foram consideradas o maior conteúdo protéico presente no tecido de armazenamento de cotilédones de leguminosas (DERBYSHIRE *et al.*, 1976). No caso particular do feijão caupi, a maioria das proteínas extraídas das sementes representa a fração globulina (SALES *et al.*, 2000; MOTA *et al.*, 2003; UCHÔA *et al.*, 2006).

2.3.2. Proteínas de Feijão Caupi que Limitam a sua Utilização e Valor Nutricional

O feijão caupi apesar de ser boa fonte de proteínas, energia e de outros nutrientes, além de seu baixo custo em relação a outros alimentos ricos em proteínas, tem sua utilização de certa forma comprometida pela presença, principalmente, de fatores antinutricionais e/ou tóxicos. Dentre os de natureza química protéica, destacam-se inibidor de tripsina, lectina e urease (LIENER, 1994; MAIA *et al*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Em geral, os efeitos da presença de inibidores de tripsina na dieta compreendem: 1) alteração moderada da digestibilidade das proteínas; 2) redução da absorção de nitrogênio e enxofre; 3) indução de hipertrofia e hiperplasia pancreática e estimulação excessiva da secreção enzimática; 4) aumento da síntese de tripsina e quimiotripsina pelo pâncreas (desse modo, aumentando a demanda de metionina e cisteína); 5) diminuição da taxa de crescimento em animais testes (esse efeito pode ser prevenido por inativação dos inibidores por calor, cocção ou suplementação com metionina); 6) estímulo da perda endógena de nitrogênio e enxofre; 7) estimulação da síntese e liberação de fatores hormonais, tais como colecistocinina que estimula a secreção enzimática do pâncreas e 8) hiperplasia nodular, adenoma acinar e adenocarcinoma (em longo prazo e dependente da ingestão e do nível de proteínas da dieta) (NORTON, 1991; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). No caso em particular do feijão caupi, a inclusão de farinha de sementes, e não proteínas purificadas, induziu rápido crescimento do pâncreas de ratos durante os 150 dias iniciais, e somente após 350 dias é que ocorreu um segundo período de crescimento rápido. Assim, o padrão geral do crescimento pancreático observado foi, provavelmente, um resultado combinado das mudanças dependentes da idade, da susceptibilidade do pâncreas à ação de fatores antinutricionais da semente e do efeito acumulativo que surge do uso prolongado de dietas contendo essas sementes (GRANT *et al.*, 1993). A exposição prolongada ao inibidor de tripsina, aumentou, também, a incidência

de lesões pancreáticas pré-neoplásicas e de câncer pancreático (GRANT *et al.*, 1995).

Quanto à lectinas, vários estudos têm sido conduzidos a fim de verificar os efeitos antinutricionais causados pela presença dessas proteínas na dieta. A propriedade de muitas lectinas está vinculada à sua resistência à proteólise durante a passagem pelo trato digestório, interferindo no aproveitamento dos nutrientes (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Ademais, lectinas podem se ligar nas microvilosidades das células do epitélio intestinal, chegando, muitas vezes, a causar ruptura de membranas e degradação de microvilos, acarretando lesão no epitélio e diminuição da camada de muco que protege o tecido epitelial do intestino delgado, principalmente duodeno e jejuno. Algumas lectinas podem, ainda, ser internalizadas nos enterócitos, atingir o sistema circulatório e, então, atuar de modo sistêmico, causando diversas alterações metabólicas (LIENER, 1994; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). No caso do feijão caupi, não foram encontrados trabalhos mostrando os efeitos da lectina purificada.

Mais recentemente, efeitos deletérios foram vinculados à urease. As evidências são oriundas de observações feitas a partir de ureases de soja. Inicialmente, Vasconcelos e colaboradores (2001) demonstraram que as ureases presentes em farinha de sementes de soja foram capazes de influenciar negativamente o consumo de alimentos e o ganho de peso de ratos, afetando de forma significativa os valores relativos à Utilização Líquida da Proteína (NPU), digestibilidade e peso relativo de órgãos internos. Quando o modelo experimental foi mudado de ratos para frangos de corte, num experimento semelhante, novamente as ureases de soja se sobressaíram como uma proteína antinutricional e/ou tóxica. As alterações descritas foram verificadas quando as dietas foram formuladas com farinha das sementes contendo diferentes teores de ureases. Quando urease purificada de sementes quiescentes de soja foram administradas por via oral a ratos, usando uma sonda orogástrica, essa proteína foi capaz de induzir alterações na mucosa gástrica dos animais e de elevar o pH do conteúdo estomacal, de forma semelhante ao verificado com a bactéria *Helicobacter pylori*, evidenciando suas propriedades tóxicas (MAIA, 2008). Apesar das alterações descritas terem sido

causadas pela urease de soja, dada a grande similaridade estrutural entre as ureases, é possível a que proveniente do caupi induza efeito semelhantes.

No contexto de proteínas que limitam utilização do feijão caupi, torna-se oportuno que sejam ressaltadas as propriedades alergênicas de algumas globulinas, em particular as leguminas provenientes de amendoim, amêndoa, castanha e de outras oleaginosas (MARTINS, 2006).

2.4. Melhoramento Genético e Biossegurança Alimentar

Apesar da elevada variabilidade genética, da capacidade de adaptação e do alto potencial produtivo do feijão caupi, quando comparado a outras culturas, o seu potencial genético poderia ser mais explorado (FREIRE FILHO *et al.*, 1999). A complexidade do melhoramento do feijão caupi é decorrente de várias características da planta e semente, tempo de maturidade e sistemas de produção usados, que são diferentes de região para região. Todavia, há necessidade de desenvolvimento de genótipos com diferentes atributos e resistência aos estresses bióticos e abióticos, para atender as necessidades específicas de diferentes regiões e arranjos produtivos (SINGH *et al.*, 1997; FREIRE FILHO *et al.*, 1999).

Dentre os diversos objetivos relacionados ao melhoramento do feijão caupi, destacam-se, sobretudo, o desenvolvimento de genótipos com grãos de alta qualidade e com resistência múltipla a patógenos e pragas. No início, o melhoramento teve como principal finalidade o aumento da produtividade. Posteriormente, o melhoramento priorizou também a resistência a doenças e pragas, não esquecendo a qualidade do grão e a arquitetura da planta (FREIRE FILHO *et al.*, 2000). Porém, dada à importância nutricional do feijão caupi, é importante que aliado ao melhoramento genético, através do uso de métodos clássicos ou modernos (transgenia), sejam realizados estudos com ênfase na biossegurança alimentar, com enfoque especial na avaliação do valor nutricional, de modo a complementar ou mesmo validar os resultados

obtidos derivados dos procedimentos adotados visando o melhoramento da cultura.

2.4.1. Biossegurança Alimentar

Atualmente, uma das grandes preocupações relacionadas ao melhoramento genético, especialmente quando se faz uso da engenharia genética, está em assegurar a ausência de riscos, isto é, que as modificações introduzidas resultam efetivamente no aumento da produção, na melhoria da qualidade dos alimentos e na diminuição do uso de defensivos químicos. Desse modo, reduzindo o impacto da agricultura no meio ambiente e não comprometendo o valor nutricional dos alimentos e nem afetando a saúde humana. Os organismos modificados geneticamente (OMGs) são organismos vivos e, portanto, diferentemente dos produtos químicos que podem se diluir, têm o potencial de se dispersar para novos habitats, colonizar novas áreas e se multiplicar. Suas novas atividades, incluindo a geração de produtos metabólicos, enzimas e toxinas, irão continuar a ocorrer, desde que o OGM se mantenha metabolicamente ativo. Combinações genéticas resultantes de manipulação genética de genes já existentes podem produzir efeitos não intencionais ou indesejáveis. Uma vez estabelecidos, organismos vivos não podem ser revogados. Daí, a preocupação em se tomar os cuidados necessários para a liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados (NUTTI, 2003; WHO, 2000).

Embora as plantas e os animais geneticamente modificados sejam rotineiramente analisados quanto à produtividade, eficiência reprodutiva, reações a doenças, e características qualitativas, eles não são avaliados quanto aos seus possíveis efeitos não intencionais a nível molecular. Novas variedades de alimentos geneticamente modificados pela tecnologia do rDNA recombinante são raramente objeto de estudo toxicológico ou outro tipo de avaliação de segurança (WHO, 2000). Dessa forma, o maior problema na análise de risco dos organismos gerados pela biotecnologia é que seus efeitos

não podem ser previstos em sua totalidade. Os riscos à saúde humana incluem alergias, toxicidade e intolerância. No ambiente, as conseqüências são a transferência lateral de genes, a poluição genética e os efeitos prejudiciais a organismos não-alvo. Com a aprovação em janeiro de 2002 do Protocolo Internacional de Biossegurança, o princípio da precaução foi estabelecido como básico e a rotulagem tornou-se obrigatória. A percepção pública obriga empresas e cientistas a um maior uso da ciência na análise de risco antes do consumo desses alimentos (NODARI *et al.*, 2003). O risco é tecnicamente a probabilidade de um evento danoso multiplicado pelo dano causado. Então, se o dano é grande, mesmo uma baixa probabilidade pode significar um risco inaceitável. Portanto, o impacto de um transgene no ambiente e na saúde humana deve ser criteriosamente avaliado (NODARI 2003; GUERRA, 1999).

A FDA (Food and Drug Administration), a FAO (Food and Agriculture Organization) e a OMS (Organização Mundial da Saúde), estabeleceram como critério para avaliação dos alimentos geneticamente modificados o conhecimento de sua Equivalência Substancial (ES), que se baseia na idéia de que alimentos já existentes podem servir como base para a comparação do alimento geneticamente modificado (WATANABE e NUTTI, 2002). Tal abordagem não se destina ao estabelecimento da segurança absoluta, meta praticamente inatingível para qualquer alimento. O objetivo é garantir que o alimento melhorado seja tão seguro quanto seus análogos convencionais (WHO, 2000). Se um alimento modificado biotecnologicamente não apresenta nenhuma diferença na composição de seus nutrientes ou anti-nutrientes em relação ao seu análogo convencional, ele é considerado um ES. Dessa maneira, o ES é uma avaliação analítica que compara a composição de um alimento modificado geneticamente com um alimento análogo já existente. O conceito de ES está associado, quase que somente, à avaliação de plantas geneticamente modificadas por tecnologia do rDNA, mas também poderia ser expandido para outros organismos geneticamente modificados, ou organismos modificados por outras biotécnicas ou, ainda, por melhoramento tradicional (PERDERSON, 2000; SCHAUZU, 2002; ATHERTON, 2002).

Alguns fatores devem ser considerados na avaliação da ES, que incluem: identidade, fonte e composição dos organismos geneticamente modificados; os efeitos do processamento/cozimento sobre alimentos geneticamente modificados; o processo de transformação; o produto da expressão da proteína do novo DNA; possíveis efeitos

secundários da expressão do gene (que incluem a composição em macro e micronutrientes críticos, antinutrientes, fatores tóxicos endógenos, alérgenos e substâncias fisiologicamente ativas); ingestão potencial e impacto da introdução do alimento geneticamente modificado na dieta. Três possíveis conclusões podem ser tiradas quando a ES é estabelecida: 1) o alimento ou ingrediente alimentar é geneticamente modificado é substancialmente equivalente ao análogo convencional, quanto à sua composição e aos seus aspectos agronômicos e toxicológicos; 2) o alimento geneticamente modificado ou ingrediente alimentar é substancialmente equivalente ao análogo convencional, exceto por algumas poucas diferenças claramente definidas; 3) o alimento geneticamente modificado ou ingrediente alimentar não é substancialmente equivalente, porque diferenças não podem ser definidas ou porque o análogo convencional não existe (ATHERTON; 2002).

2.4.2. Avaliação Qualitativa dos Alimentos

A necessidade do aumento e da melhoria da qualidade da produção vegetal com a finalidade de suprir a crescente demanda por alimento é uma realidade. Até mesmo porque a nutrição humana é 100% influenciada pela qualidade dos produtos vegetais, particularmente quando considerado o teor de proteínas, geralmente o componente limitante no valor nutritivo das dietas.

Embora a composição química de uma fonte alimentícia forneça informações valiosas em termos quantitativos, esta não abrange dados acerca dos efeitos da maioria dos fatores considerados antinutricionais e/ou tóxicos. Numa avaliação mais fidedigna, é necessário que a amostra teste seja administrada a animais experimentais, com o cálculo posterior de diversos parâmetros biológicos.

Um dos índices que mede a qualidade de uma proteína é a digestibilidade (D). Esta pode ser definida pela medida da percentagem de proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou outro composto nitrogenado. Sua medida "in vivo" é feita através do cálculo da razão percentual entre o nitrogênio (N) absorvido, o ingerido vinculado à dieta e o eliminado nas fezes (ANDERSON *et al.*, 1988;

SGARBIERI, 1996). Uma forma simples de calcular a digestibilidade aparente (Da), é dada pela seguinte fórmula:

$$Da = \frac{N \text{ ingerido} - N \text{ fecal}}{N \text{ ingerido}} \times 100 = \frac{N \text{ absorvido}}{N \text{ ingerido}} \times 100$$

Essa fórmula, entretanto, não é totalmente correta! Isso porque nem todo nitrogênio excretado nas fezes corresponde a resíduos alimentares não digeridos, podendo ser proveniente de descamação de camadas epiteliais, por exemplo (Nitrogênio fecal endógeno). Para tanto, é feita uma correção através do cálculo da digestibilidade verdadeira (Dv) ou real através da fórmula:

$$Dv = \frac{N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal} - N \text{ fecal endógeno})}{N \text{ ingerido}} \times 100$$

Uma outra forma bastante difundida de avaliar a qualidade protéica é através do cálculo da NPU (Utilização Líquida de Proteína). O método original é o de Miller e Bender (1955), baseado na percentagem do nitrogênio ingerido que ficou retido no organismo, sendo o nitrogênio retido determinado pelo teor de nitrogênio total da carcaça dos grupos de ratos mantidos com a fonte protéica em estudo, comparado com o nitrogênio da carcaça do grupo aprotéico (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1996). Pode ser calculada a partir dos

valores relativos ao nitrogênio, deduzidos da quantidade de nitrogênio excretada nas fezes e urina.

$$\text{NPU} = \frac{\text{N retido} - (\text{N fecal} + \text{N urinário})}{\text{N ingerido}} \times 100$$

NPU pode ser determinada, também, através de ensaios com animais experimentais em crescimento, utilizando-se dados do nitrogênio total da carcaça do grupo mantido na dieta contendo 10% de proteína (G1) e do grupo em dieta aprotéica (G2) (MILLER e BENDER, 1955). A relação é a seguinte:

$$\text{NPU} = \frac{\text{N corporal de G1} - \text{N corporal do G2}}{\text{N ingerido pelo G1}} \times 100$$

A relação entre o nitrogênio retido e o nitrogênio absorvido, representando o nitrogênio utilizado pelo metabolismo animal, pode ser estabelecida através do cálculo do Valor Biológico (VB). O nitrogênio retido e o absorvido da dieta são obtidos a partir da análise do nitrogênio da urina e das fezes em condições basais (sem a ingestão de proteínas) e após a ingestão de

proteínas (MILLER e BENDER, 1955; LAJOLO *et al.*, 1989). O VB pode ser calculado a partir da expressão:

$$VB = \frac{N \text{ retido}}{N \text{ absorvido}} \times 100$$

Da mesma maneira que a digestibilidade, o Valor Biológico Verdadeiro (VB_v) pode ser, também, determinado. A correção é realizada sobre os valores fecais e urinários em relação ao nitrogênio de origem endógena. A expressão correspondente é a seguinte:

$$VBv = \frac{N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal} + N \text{ urinário})}{N \text{ ingerido} - N \text{ fecal}} \times 100$$

Quanto menor o valor biológico, maior quantidade de proteína será necessária para que o balanço nitrogenado seja igual a zero, ou seja, alcance o equilíbrio (WAITZBERG, 2000).

Há, ainda, métodos adicionais de avaliação qualitativa de uma proteína. Porém, apesar desses servirem como excelentes parâmetros de mensuração, são caracterizados, geralmente, por exigirem a execução de experimentos trabalhosos, demorados e de elevado custo. Porém, é conveniente observar que, em todos os índices de avaliação de qualidade biológica, a digestibilidade tem papel fundamental. Considerando que uma determinada fonte protéica

tenha uma composição aminoacídica ideal, é esperado que, caso essa fonte apresente uma boa suscetibilidade às enzimas proteolíticas, ela apresente um alto valor biológico. Se a dieta incluir proteínas biologicamente ativas com propriedades antinutricionais e/ou tóxicas, havendo a hidrólise dessas proteínas logo no início do processo da digestão, os seus efeitos serão anulados e os aminoácidos serão disponibilizados, absorvidos e utilizados pelo metabolismo animal. Ao contrário, isto é, havendo resistência total ou parcial à hidrólise, como observada para várias lectinas, a ocorrência de efeitos deletérios pode ser esperada (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 - Gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a biossegurança alimentar de genótipos de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] susceptível (BR9 Longá) e resistente (IT81D 1053) ao gorgulho (*Callosobruchus maculatus*; Coleoptera: Bruchidae), usando como modelo experimental ratos em crescimento. Dietas foram preparadas com farinha de sementes, suplementada ou não com metionina e, também, com as proteínas ligantes à quitina de ambos os genótipos, a fim de averiguar se o caráter suscetível ou resistente ao gorgulho dos genótipos selecionados seria capaz de causar impactos, tais como toxicidade ou alergia, em animais monogástricos (ratos) dada a importância do feijão caupi na alimentação humana.

3.2 - Específicos

- Analisar as proteínas das sementes dos genótipos suscetível e resistente ao gorgulho através da determinação da composição centesimal, dosagem de proteínas solúveis e análise em eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Detectar e dosar as proteínas com propriedades antinutricionais e/ou tóxicas, tais como lectinas, inibidores de tripsina e urease em farinha das sementes de ambos genótipos;
- Avaliar o impacto de dietas contendo farinha de sementes cruas, não suplementada e suplementada, dos genótipos suscetível e resistente ao gorgulho sobre ratos em crescimento, considerando vários parâmetros nutricionais e toxicológicos;
- Purificar as proteínas ligantes à quitina dos genótipos suscetível e resistente ao gorgulho e incluí-las nas dietas para ratos em crescimento, a fim de averiguar sua importância como fator antinutricional e/ou tóxico para esses animais;

- Avaliação da alergenicidade das proteínas ligantes à quitina dos genótipos, suscetível e resistente ao gorgulho, para ratos.

4. MATERIAIS

4.1. Sementes

Sementes quiescentes de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775), respectivamente, foram cedidas pelo Laboratório de Citogenética, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte (CPAMN), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Teresina-PI. O genótipo BR9 Longá é originário do melhoramento genético da população TVx3777-04E, proveniente do International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigéria. O genótipo IT81D-1053 é uma linhagem também melhorada conhecida como CNC-0001381, introduzida do IITA no ano de 1989.

4.2. Hemácias

Hemácias de coelho albino, linhagem Nova Zelândia, utilizadas nos ensaios de aglutinação, foram obtidas de animais adultos e sadios mantidos no biotério de Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.3. Animais

No ensaio de avaliação nutricional da farinha e proteínas ligantes à quitina dos genótipos em estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) da linhagem "Wistar", brancos, machos. Na obtenção de antissoro, foram usados camundongos Swiss (*Mus musculus* Linnaeus, 1758). Em ambos os casos animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFC.

4.4. Reagentes Químicos

Acrilamida, *N,N*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina (BSA), *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida, inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz, tripsina, papaína, pepsina, quimiotripsina, marcadores de massa molecular, *N,N,N',N'* tetrametiletanolamina, "Coomassie Brilliant Blue" G e R, urease, laminarina, D-glucose, guaiacol, quitina, dimetilaminobenzaldeído, *N*-acetil-D-glucosamina, glucuronidase e tetraborato de potássio foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis.

Dodecil sulfato de sódio e β -mercaptoetanol foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

Os demais reagentes, todos de grau analítico, foram obtidos comercialmente.

5. MÉTODOS

5.1. Preparação da Farinha de Cotilédones

Sementes íntegras de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus* (gorgulho), respectivamente, foram trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho para café. As farinhas resultantes foram transferidas para frascos hermeticamente fechados e conservadas a 4 °C.

5.2. Composição Centesimal

5.2.1. Determinação do Teor de Umidade

Frascos secos a 100 °C e tarados, contendo cerca de 2,0 g de farinha dos genótipos estudados, foram colocados em estufa a 100 °C. Após 24 horas, os frascos contendo as amostras foram transferidos para um dessecador e mantidos até que atingissem a temperatura ambiente sendo, então, pesados. Em seguida, estes foram colocados novamente na estufa por mais 12 horas, transferidos para um dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesados. Este procedimento foi repetido até obtenção de pesos constantes. O teor de umidade foi determinado através da diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo esse valor expresso em percentagem.

5.2.2. Determinação do Teor de Cinzas

O resíduo mineral das amostras foi determinado através da incineração em mufla a 600 °C por 4 horas de amostras contendo 2 g de farinha integral de sementes, acondicionadas em cadinhos de porcelana previamente limpos,

secos e tarados. Decorrido o tempo de calcinação, os cadinhos foram colocados em um dessecador até que atingissem a temperatura ambiente e pesados. O conteúdo de cinzas foi calculado pelo quociente entre o peso final e o peso inicial das amostras, expresso em porcentagem.

5.2.3. Determinação do Teor de Proteína Total

O conteúdo protéico das amostras de farinha de sementes de caupi foi determinado pelo método de Kjeldahl, adaptado para medida do teor de nitrogênio através do método colorimétrico proposto por Baethgen e Alley (1989).

Amostras contendo 0,02 g de farinha foram acondicionadas em tubos de mineralização juntamente com 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,1 g de mistura sólida composta de sulfato de potássio (acrescentado para aumentar o ponto de ebulição do ácido), selênio e sulfato de cobre (catalisadores, adicionados para acelerar a digestão da matéria orgânica) na proporção de 100:10:1. A mistura foi aquecida em digestor até a completa mineralização da amostra. A solução concentrada de sulfato de amônio produzida foi diluída para 50 mL com água grau Milli-Q e utilizada para o ensaio colorimétrico. O nitrogênio total foi estimado com base em curva padrão construída com solução de sulfato de amônio. A proteína bruta foi calculada através da multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

5.2.4. Determinação do Teor de Lipídios

Os lipídios totais foram determinados por extração à quente com *N*-hexano (AOAC, 1980). Amostras contendo 2 g de farinha de sementes foram acondicionadas em cartuchos duplos de papel de filtro. Estes foram colocados no compartimento apropriado de extratores de Soxhlet acoplados a balões

previamente desengordurados, secos e tarados. Em seguida, o solvente foi adicionado e o conjunto aquecido por 8 horas, contadas a partir do ponto de ebulição do *N*-hexano. Concluída a extração, o solvente foi parcialmente recuperado e os balões, contendo o componente lipídico das sementes e algum resíduo de solvente, foram levados para estufa a 105 ± 5 °C por 12 horas. Passado o período de evaporação total do solvente, os balões foram transferidos para dessecador sem contato manual e, após atingirem a temperatura ambiente, foram pesados. O conteúdo lipídico foi calculado pela diferença entre o peso de cada balão antes e depois do processo de extração e expresso como percentagem do peso seco das amostras.

5.2.5. Determinação do Teor de Fibra Bruta

O teor de fibra bruta foi determinado de acordo com a AOAC (1980). Amostras da farinha dos genótipos estudados (2 g) foram colocadas em recipientes de refluxação do aparelho digestor (Sistema de Fibra Bruta/Modelo TR 146/8-50 e TE 146/5-50) juntamente com 100 mL da solução de H₂SO₄ a 1,25% e submetidas à fervura por 30 minutos, contados a partir do ponto de ebulição. Concluída a digestão ácida, procedeu-se a filtração com a haste de tela (200 – 400 mesh), lavando a tela com água destilada fervente sobre os resíduos. O material retido na tela foi removido com uma solução de NaOH a 1,25% previamente aquecida (100 mL). O material foi novamente colocado no aparelho digestor e submetido à fervura por mais 30 minutos. Concluída a digestão alcalina, o resíduo da hidrólise (água, fibra e minerais) foi filtrado em cadinho poroso adaptado a um recipiente acoplado a uma bomba de vácuo. O resíduo sólido final foi lavado com álcool absoluto (20 mL) e, posteriormente, com éter etílico (10 mL) a fim de facilitar a secagem. Os cadinhos foram então colocados em estufa com circulação forçada de ar por 12 horas a 105 °C. Em seguida, os recipientes foram transferidos para o dessecador e pesados. Essa pesagem forneceu o peso do material que constava de fibras e minerais. O passo seguinte foi uma calcinação em mufla a 500 °C, durante 4 horas. Nesta

etapa toda fibra foi oxidada, restando apenas minerais. O valor referente à fibra bruta foi obtido pela diferença entre o peso do resíduo das digestões antes da calcinação e o resíduo mineral final, sendo o resultado expresso como porcentagem do peso seco da farinha das sementes.

5.3. Caracterização das Proteínas das Sementes

5.3.1. Extração das Proteínas Solúveis

Para a extração das proteínas totais, farinhas dos genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao gorgulho, respectivamente, foram colocadas em contato com tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,0 (PBS), na proporção de 1:10 (p/v), por 4 horas, a 4 °C, sob agitação constante. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 10 000 x *g*, por 30 minutos, filtradas em pano de trama fina, sendo o sobrenadante denominado de extrato bruto.

5.3.2. Dosagem de Proteínas

Para determinação do teor de proteínas foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 µL de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso foram feitas leituras das absorbâncias a 595 nm (espectrofotômetro tipo Espectronic Genesys 8, Spectronic Instruments). A concentração protéica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de BSA.

5.3.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (PAGE-SDS)

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições desnaturantes, seguindo-se a metodologia de Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 16 x 18 cm. A eletroforese foi realizada em gel vertical de 1,5 mm de espessura, composto por um gel de aplicação (3,5% de acrilamida e 1% de SDS em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8) e um gel de separação (15% de acrilamida e 1% de SDS em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8).

Amostras contendo 4 mg de farinha de sementes de feijão caupi, ou 2 mg de proteínas purificadas, foram suspensas em 1 mL de tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,8, contendo 1% de SDS e igual concentração de β -mercaptoetanol. As suspensões foram incubadas por 10 minutos a 100 °C e, subsequentemente centrifugadas a 14 000 $\times g$ (centrífuga “Eppendorf” 541 7R), por 10 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foi acrescentado azul de bromofenol, a fim de permitir visualização da corrida eletroforética. Alíquotas encerrando 20 μ L foram aplicadas por poço e a corrida conduzida a corrente constante de 20 mA, durante aproximadamente 2 horas. As bandas protéicas foram visualizadas por coloração com “Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05%”. As massas moleculares aparentes das bandas protéicas foram determinadas por comparação de sua mobilidade eletroforética com aquelas apresentadas pelos seguintes marcadores protéicos: albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa); gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36,0 kDa); anidrase carbônica bovina (29,0 kDa); tripsinogênio pancreático bovino (24,0 kDa); inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (21,0 kDa) e α -lactoalbumina bovina (14,2 kDa).

5.4. Detecção e Dosagem de Proteínas com Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas

5.4.1. Lectina

Para detecção e dosagem de lectina foi empregada a técnica de hemaglutinação segundo metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977). As amostras foram submetidas a diluições seriadas em tubos de ensaio, na presença de NaCl 0,15 M (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 etc). A 0,25 mL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias de coelho a 2% tratadas ou não com enzimas proteolíticas. Os tubos foram incubados a 37 °C, 30 minutos, deixados em repouso por mais 30 minutos ou 15 horas à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 3.000 x g, por 30 segundos, à temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidades de hemaglutinação (UH), definida como inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de aglutinar hemácias.

A metodologia utilizada para o tratamento enzimático das hemácias foi a descrita por Lis e Sharon (1972). Uma amostra de 1 mL de sangue heparinizado de coelhos foi lavada três vezes com NaCl 0,15 M e, subseqüentemente, incubadas por 60 minutos a 4 °C com a tripsina, na proporção de 0,1 mg de enzima para 10 mL da suspensão de células. A seguir, a lavagem dessas células foi efetuada com solução de NaCl 0,15 M, por seis vezes, sendo o volume final de hemácias suspenso em NaCl em volume necessário para a obtenção de uma suspensão a 2%.

5.4.2. Inibidor de Tripsina

Com o intuito de determinar a presença de inibidor de tripsina nas sementes dos genótipos, foi empregada a técnica originalmente descrita por Kakade com algumas modificações (HAMERSTRAND *et al.*, 1981). Farinhas dos genótipos estudados (0,02 g) foram suspensas em 1 mL de NaOH 0,01 M, deixadas sob agitação constante por 3 horas à temperatura ambiente e, em seguida, em repouso por 30 minutos. Os sobrenadantes foram centrifugados a 14 000 x *g*, por 5 minutos. Após centrifugação, alíquotas de 0,1 mL desses extratos foram retiradas e incubadas a 37 °C num meio de reação que consistia de 1,6 mL de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2, contendo CaCl₂ 0,02 M, 0,1 mL de tripsina (solução estoque de 0,4 mg em 10 mL de HCl 0,001 M) e o substrato BAPNA. A reação foi interrompida com 0,2 mL de ácido acético 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. Os resultados foram calculados considerando a curva padrão obtida com inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz e expressos como a quantidade em mg de tripsina inibida (UI) por g de farinha.

Para dissolução de 10 mg de BAPNA foi usado, primeiramente, 0,5 mL de dimetilsulfóxido que foi agitado vigorosamente em vortex até a completa dissolução do substrato. Em seguida, o volume foi completado para 1 mL com água grau milli-Q, sendo esta solução novamente agitada e usada imediatamente.

5.4.3. Urease

A determinação da atividade ureásica foi feita como descrito por Kaplan (1969), com algumas modificações. A 0,1 mL de uma solução de uréia 0,5 M foram adicionados 0,7 mL de uma solução de EDTA tamponado com fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, e 0,1 mL do extrato bruto com concentração ajustada para 0,2 mg de proteína por mL. A mistura foi incubada por 15 minutos a 37 °C e, então, adicionado 1 mL de uma solução de fenol com nitroprussiato de sódio (62 g de fenol + 0,25 g de

nitroprussiato por litro). Subseqüentemente, foi acrescentado 1 mL de uma solução de hipoclorito de sódio mais hidróxido de sódio (43 mL de hipoclorito de sódio comercial a 5,25%, mais 20 g de NaOH em água q.s.p. 1000 mL). A mistura completa foi incubada por mais 5 minutos a 37 °C, seguida da adição de 7 mL de água grau Milli-Q e agitação vigorosa em vortex. As leituras das absorvâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação a uma curva obtida com urease comercial (Sigma 41H7008 - 870.000 U/g).

5.5. Purificação das Proteínas Ligantes à Quitina (PLQ)

Amostras (250 mgP) do extrato total dos genótipos de feijão caupi suscetível e resistente ao gorgulho foram aplicadas à coluna de quitina (38,0 x 1,6 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,0 (FIGURA 5). Logo após a entrada da amostra no gel, o fluxo da coluna foi interrompido por 30 minutos. Transcorrido o tempo de contato da amostra com o gel, o fluxo foi reiniciado e frações foram, então, coletadas. O primeiro pico (quitina-I), concentrando as proteínas que não se ligaram à matriz, foi eluído com o próprio tampão de equilíbrio até não haver mais leitura de absorvância em 280 nm. Em seguida, foi aplicada uma solução de ácido acético 0,2 M para eluição das proteínas retidas (quitina II). A cromatografia foi realizada a um fluxo constante de 100 mL/hora, sendo coletados 5 mL por tubo. Os eluatos foram monitorados através de medidas da absorvância em 280 nm. A fração protéica retida em coluna de quitina foi dialisada, liofilizada e, em seguida, avaliada por PAGE-SDS, submetida a testes de digestibilidade *in vitro* e usadas em ensaios biológicos para avaliação de seu potencial antinutricional, tóxico e alergênico.

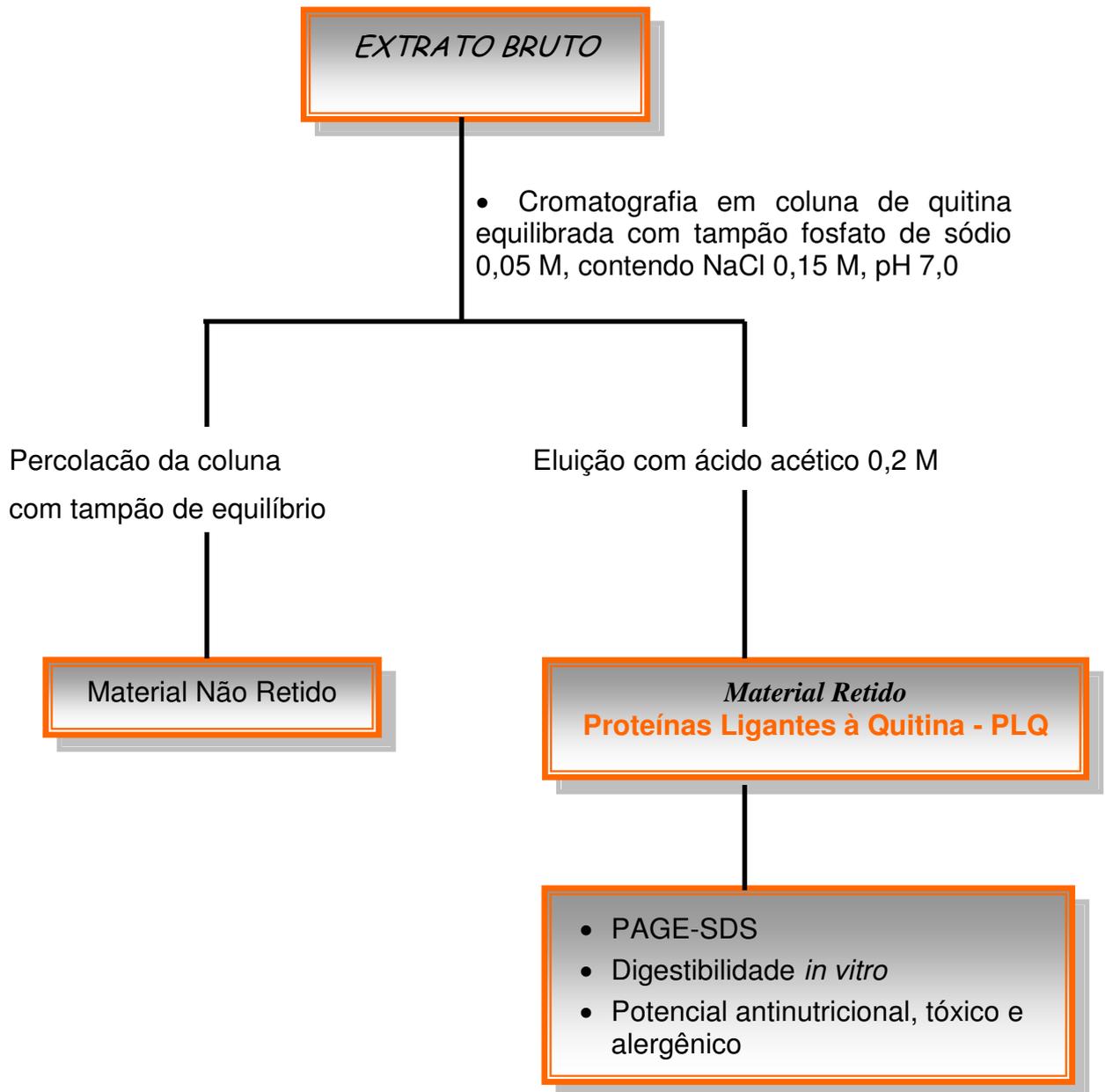


FIGURA 5. Esquema de obtenção das proteínas ligantes à quitina a partir do extrato bruto preparado de farinhas das sementes de genótipos de feijão caupi suscetível (BR9 Longá) e resistente (IT81D 1053) ao *Callosobruchus maculatus*.

5.6. Avaliação da Digestibilidade *In vitro* das PLQ

5.6.1. Ação individual da pepsina, tripsina, quimiotripsina e papaína sobre as PLQ

Inicialmente, 10 mg de proteína foram dissolvidos em 5 mL de HCl 0,1 N. Dessa solução, foram retiradas 5 alíquotas de 250 μ L, e adicionados 50 μ L de uma solução de pepsina (1 mg/mL em HCl 0,1 N, pH 1,75). Esta proporção equivale a uma relação enzima/proteína de 10:100. As alíquotas foram colocadas em banho-maria a 37 °C durante 0,5, 1, 2, 4, e 6 horas. Cada alíquota retirada foi acrescida imediatamente de 250 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, SDS 2%, pH 6,8) 2 vezes concentrado para eletroforese e aquecida a 100 °C, por 5 minutos. A cada uma das amostras foi adicionada 1 gota de azul de bromofenol a 0,02% e cristais de sacarose, preparando-se, assim, para a corrida eletroforética. O tempo zero consistiu da amostra mais o tampão de corrida.

A metodologia utilizada na digestão pela tripsina, quimiotripsina e papaína obedeceu à mesma seqüência descrita para o tratamento enzimático pela pepsina, alterando, além das enzimas, a solução de HCl 0,1 N para o tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1 (tripsina e quimiotripsina), ou fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0 (papaína).

A verificação da atividade catalítica das enzimas utilizadas (pepsina, tripsina e quimiotripsina) foi realizada através dos mesmos ensaios enzimáticos descritos acima com uma proteína reconhecidamente de fácil digestão, no caso, a albumina sérica bovina (BSA). Os tratamentos enzimáticos com a BSA só foram acompanhados nos tempos de 30 minutos e 1 hora.

5.6.2. Ação Seqüencial da Pepsina, Tripsina e Quimiotripsina

Para realizar digestão *in vitro* de forma seqüencial 10 mg das PLQ foram dissolvidos em 500 μ L de solução de pepsina 0,02 mg/mL de HCl 0,1 N, pH 1,78, permanecendo a 37 °C, por 2 horas. Ao término desse período, foram retirados 250 μ L de amostra, sendo 150 μ L acrescido, imediatamente, de tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 2%) dez vezes concentrado e aquecidos a 100 °C, por 5 minutos, e os outros 100 μ L acrescido de igual volume de tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 8,91, objetivando inativar a pepsina e realizar eletroforese da amostra. Aos 250 μ L restantes foram adicionados 250 μ L de uma solução de tripsina mais quimiotripsina (0,02 mg/mL de Tris-HCl 0,25 M, pH 8,91), previamente estabilizada a 37 °C, e permanecendo nesta temperatura por 3 horas. As soluções enzimáticas foram preparadas de forma a proporcionar uma relação enzima/amostra de 1:100. Ao término das 3 horas, alíquota de 250 μ L foi acrescida, imediatamente, de tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 2%) dez vezes concentrado e aquecida a 100 °C, por 5 minutos. Os 250 μ L restantes, foram usados na eletroforese. Como controle da ação catalítica das enzimas, albumina sérica bovina foi submetida à digestão, na mesma proporção da amostra teste, e coletadas alíquotas nos mesmos tempos que as amostras teste.

5.7. Ensaio Biológicos

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991), e aprovados pelo Comitê de Ética e Biossegurança com Animais da UFC.

5.7.1. Ensaio Biológico I - Avaliação da Qualidade Nutricional das Proteínas de Sementes de Genótipos de Feijão caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao *Callosobruchus maculatus* (gorgulho)

5.7.1.1. Dietas

Foram preparados seis tipos de dietas (TABELA 1) isocalóricas e isoprotéicas, exceto no caso da dieta NPC, isenta de proteínas ou derivados nitrogenados, que foi utilizada para fins de controle e cálculo dos parâmetros nutricionais. Os outros cinco tipos foram preparados de forma a conter as seguintes variantes protéicas:

- *Clara do ovo* - Dieta controle contendo 10% de proteína bruta oriunda de albumina da clara do ovo de galinha;
- *Suscetível -M* - O percentual de 10% de proteína foi constituído pela farinha de sementes de feijão caupi do genótipo suscetível (BR9 Longá) ao gorgulho;
- *Suscetível +M* - O percentual de 10% de proteína foi constituído pela farinha de sementes de feijão caupi do genótipo suscetível (BR9 Longá) ao gorgulho, suplementada com metionina para cobrir os requerimentos de ratos (COATES *et al.* 1969);

TABELA 1. Composição (g/Kg) das dietas controle (clara do ovo e aprotéica) e experimentais (farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR 9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente)

Ingredientes	NPC [#]	Clara do ovo	Suscetível		Resistente	
			-M [*]	+M [¶]	-M	+M
Amido de milho	500	381,5	84,4	84,4	30,5	30,5
Fécula de mandioca	100	100	100	100	100	100
Glicose	150	150	150	150	150	150
Óleo de milho	150	150	150	150	150	150
Vitaminas ^δ	50	50	50	50	50	50
Minerais [§]	50	50	50	50	50	50
Clara do ovo	-	118,5	-	-	-	-
BR9 Longá	-	-	415,6	413,2	-	-
IT81D 1053	-	-	-	-	469,5	467,1
Metionina	-	-	-	2,4	-	2,4

[#] NPC - Controle não protéico.

^{*} -M - Farinha não suplementada com metionina.

[¶] +M - Farinha suplementada com metionina

^δ Mistura de vitaminas [vitamina B₁₂ (100%) 0,02; ácido fólico 0,04; biotina (99%) 0,04; piridoxina HCl 0,04; tiamina HCl 0,04; riboflavina (99%) 0,21; pantotenato de cálcio (97,5%) 1,20; ácido nicotínico 4,00; inositol 4,00; *p*-amino-benzóico 12,00; cloreto de colina (50%) 24,00 e amido de milho 954,39].

[§] Mistura de minerais (sulfato de cobre pentahidratado 0,40; sulfato férrico heptahidratado 5,00; sulfato manganês 3,03; sulfato de zinco heptahidratado 3,60; iodato de potássio 0,04; iodeto de potássio 0,04; fluoreto de sódio 0,12; vanadato de amônia 0,01; cloreto de níquel hexahidratado 0,08; clorato de estanho pentahidratado 0,12; selenito de sódio 0,006).

- *Resistente -M* - O percentual de 10% de proteína foi constituído pela farinha de sementes de feijão caupi do genótipo resistente (IT81D 1053) ao gorgulho;
- *Resistente +M* - O percentual de 10% de proteína foi constituído pela farinha de sementes de feijão caupi do genótipo resistente (IT81D 1053) ao gorgulho, suplementada com metionina para cobrir os requerimentos de ratos (COATES *et al.* 1969).

Em todas as dietas foram incluídas vitaminas e minerais, de tal forma que os únicos fatores variáveis foram: procedência da proteína; suplementação ou não com metionina e ausência completa de proteínas, no caso da dieta NPC (TABELA 1).

5.7.1.2. Animais

Para avaliação da qualidade nutricional foram utilizados como modelo de animais monogástricos (mamíferos) ratos da linhagem "Wistar", brancos, machos, desmamados aos 21 dias e adaptados à alimentação com ração pulverizada, até que fosse atingido o peso médio de 62 ± 5 g. Grupos homogêneos de animais, com base no peso corpóreo, foram selecionados, separados individualmente nas gaiolas metabólicas e alimentados por 3 dias com dieta contendo albumina da clara de ovo, *ad libitum*, para adaptação à dieta na forma pulverizada, atingindo peso médio de 70 ± 5 g.

5.7.1.3. Experimento

A metodologia seguida para avaliação da qualidade nutricional das proteínas das sementes dos genótipos BR 9 Longá e IT81D 1053 foi a descrita

por Miller e Bender (1955). Grupos de animais (n = 6) foram alimentados com dietas controle e experimentais, conforme apresentadas na TABELA 1. Dieta e água foram oferecidas *ad libitum*, por 10 dias. Os animais foram pesados diariamente, tendo sido, também, registrados os quantitativos individuais de dieta ingerida. As fezes foram coletadas durante os últimos cinco dias do experimento, secadas em estufa sob ventilação a 40 °C, por 24 horas, pesadas e trituradas em moinho para café, para posterior determinação de nitrogênio total (BAETHGEN e ALLEY, 1989). Ao final dos 10 dias, estes foram sacrificados por inalação com halotano, sendo seus órgãos internos (baço, coração, fígado, rins, estômago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas, pulmões e timo) dissecados, liofilizados e pesados. As carcaças foram colocadas em estufa a 100 °C, por 24 horas, pesadas e trituradas, juntamente com seus respectivos órgãos, para determinação do teor de nitrogênio corporal (BAETHGEN e ALLEY, 1989).

5.7.1.4. Determinação dos Parâmetros Nutricionais

Os parâmetros nutricionais Utilização Líquida de Proteína (NPU), Digestibilidade (D) e Valor Biológico (VB) (MILLER e BENDER, 1955) foram determinados com base nas seguintes fórmulas:

$$\text{NPU} = \frac{\text{N da carcaça do grupo teste} - \text{N da carcaça do grupo aprotéico}}{\text{N ingerido do grupo teste}}$$

$$\text{D} = \frac{\text{N ingerido} - (\text{N fecal do grupo teste} - \text{N fecal do grupo aprotéico})}{\text{N ingerido do grupo teste}}$$

$$VB = \frac{NPU}{-} \times 100$$

5.7.2. Ensaio Biológico II - Avaliação das Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas das Proteínas Ligantes à Quitina de Sementes de Genótipos de caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao *Callosobruchus maculatus* (gorgulho)

Após a purificação das quantidades necessárias das proteínas ligantes à quitina, de extrato bruto preparado a partir de farinha das sementes dos genótipos suscetível e resistente, foi iniciado o experimento de avaliação de suas propriedades antinutricionais e/ou tóxicas. O protocolo utilizado foi similar ao do Ensaio Biológico I, exceto pelo fato de que as dietas experimentais, desta vez, foram constituídas com as proteínas purificadas em matriz de quitina, conforme apresentado na FIGURA 2. Análises histológicas e medidas morfométricas foram, também, realizadas de fragmentos do duodeno e jejuno dos animais.

5.7.2.1. Dietas

Foram preparados quatro tipos de dietas (TABELA 2) isocalóricas e isoprotéicas, exceto no caso da dieta NPC, isenta de proteínas ou derivados nitrogenados, que foi utilizada para fins de controle e cálculo dos parâmetros nutricionais. Os outros três tipos foram preparados de forma a conter as seguintes variantes protéicas:

- *Clara do ovo* - Dieta controle contendo 10% de proteína bruta oriunda de albumina da clara do ovo de galinha;

TABELA 2. Composição (g/Kg) das dietas controle (clara do ovo e aprotéica) e experimentais (proteínas ligantes à quitina de sementes dos genótipos BR 9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente)

Ingredientes	NPC [#]	Clara do ovo	PLQ*	
			Suscetível	Resistente
Amido de milho	500	381,5	381,6	381,8
Fécula de mandioca	100	100	100	100
Glicose	150	150	150	150
Óleo de milho	150	150	150	150
Vitaminas ^δ	50	50	50	50
Minerais [§]	50	50	50	50
Clara do ovo	-	118,5	112,4	112,0
PLQ de BR9 Longá	-	-	6,0	-
PLQ de IT81D 1053	-	-	-	6,2

[#] NPC - Controle não protéico.

* PLQ - Proteínas ligantes à quitina purificadas a partir do extrato bruto oriundo de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR 9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente, respectivamente, ao *Callosobruchus maculatus*.

^δ Mistura de vitaminas [vitamina B₁₂ (100%) 0,02; ácido fólico 0,04; biotina (99%) 0,04; piridoxina HCl 0,04; tiamina HCl 0,04; riboflavina (99%) 0,21; pantotenato de cálcio (97,5%) 1,20; ácido nicotínico 4,00; inositol 4,00; *p*-amino-benzóico 12,00; cloreto de colina (50%) 24,00 e amido de milho 954,39].

[§] Mistura de minerais (sulfato de cobre pentahidratado 0,40; sulfato férrico heptahidratado 5,00; sulfato manganês 3,03; sulfato de zinco heptahidratado 3,60; iodato de potássio 0,04; iodeto de potássio 0,04; fluoreto de sódio 0,12; vanadato de amônia 0,01; cloreto de níquel hexahidratado 0,08; clorato de estanho pentahidratado 0,12; selenito de sódio 0,006).

- *PLQ Suscetível* - Contendo 9% da proteína bruta na forma de albumina da clara do ovo e 1% na forma de proteínas ligantes à quitina purificada do extrato bruto de sementes de feijão caupi, do genótipo suscetível (BR9 Longá) ao gorgulho;
- *PLQ Resistente* - Contendo 9% da proteína bruta na forma de albumina da clara do ovo e 1% na forma de proteínas ligantes à quitina purificada do extrato bruto de sementes de feijão caupi, do genótipo suscetível (IT81D 1053) ao gorgulho.

Os percentuais de proteínas ligantes à quitina apresentados nas dietas *PLQ Suscetível* e *PLQ Resistente* corresponde à proporção dessas proteínas em relação às proteínas totais presentes nas sementes dos respectivos genótipos. Para atingir os 10% de proteína necessários nas dietas, foi feita a complementação com albumina da clara do ovo.

5.7.2.2. Análise Histológica e Morfométrica

Os fragmentos do duodeno e jejuno foram fixados em formalina a 10%, por 24 horas. Em seguida, foram processados por meio da metodologia convencional para obtenção de fragmentos incluídos em parafina, compreendendo desidratação em soluções alcoólicas de concentração crescente (70, 80, 90, 95 e 100%), diafanização em xileno, impregnação e inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo, com espessura média de 5 μ m, e corados com hematoxilina-eosina. Imagens fotomicrográficas dos cortes histológicos preparados foram obtidas com uso de câmara digital OLYMPUS D-5060 acoplada a microscópio OLYMPUS Modelo CX-40 (aumentos de 100 e 400x).

A análise morfométrica do duodeno e jejuno abrangeu medidas da altura de vilosidades e profundidade de criptas intestinais, que foram feitas utilizando-se o programa Image J para análise de imagens, calibrado com ajuda de

lâmina micrométrica OLYMPUS AX 0001 OB-M 1/100. Foram selecionadas para medição todas as vilosidades que apresentaram integridade estrutural em toda a sua extensão, medindo-se o seu comprimento da base ao ápice. A seleção de criptas para medição incluiu apenas aquelas seccionadas longitudinalmente, com perfil tubular estendendo-se da superfície luminal à camada muscular da mucosa.

5.7.3. Ensaio Biológico III - Avaliação da Alergenicidade das Proteínas de Sementes de Genótipos de caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao *Callosobruchus maculatus* (gorgulho)

5.7.3.1. Imunização por Via Oral e Coleta de Soro

Grupos de dez camundongos, com 7 a 8 semanas de idade, foram imunizados por via oral, tendo sido utilizada sonda apropriada para alimentação intragástrica. Cada animal recebeu diariamente, durante dez dias consecutivos, 100 µL de uma solução ou suspensão contendo 100 µg de proteína de uma das seguintes fontes: ovalbumina (OVA), farinha do genótipo BR9 Longá, farinha do genótipo IT81D1053, PLQ Suscetível e PLQ Resistente, preparada em NaCl 0,15 M. Animais não imunizados receberam 100 µL de salina, seguindo o mesmo protocolo. Quatorze dias após o término das imunizações, foi dado um reforço seguindo o mesmo procedimento descrito.

Amostras de sangue foram coletadas por punção no plexo retro-orbital dos camundongos com pipetas Pasteur, nos dias zero, 7, 14, 21 e 28, após o término da última imunização. O sangue foi deixado em repouso durante 2 horas à temperatura ambiente, para retração do coágulo. Após esse tempo, o soro foi separado do coágulo, centrifugado a 600 x g, por 5 minutos. O soro livre de hemácias foi armazenado à -20° C.

5.7.3.2. Análise Sorológica por Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)

Anticorpos do tipo IgE presentes no soro dos camundongos imunizados foram quantificados através da técnica de PCA, como descrito por Ovary (1958) e modificado por Mota e Wong (1969). A determinação dos títulos de anticorpos do tipo IgE foi feita em ratos albinos machos, sendo definido como o logaritmo na base dois do inverso da diluição máxima do soro ($D_{m\acute{a}x}$) capaz de provocar reação cutânea positiva (Título de PCA = $\log_2 1/D_{m\acute{a}x}$).

Na pele da região dorsal dos animais, previamente depilada, foram injetados soros diluídos seriadamente. Após um período de latência de 18 a 22 horas, os ratos receberam na veia peniana 1 mL de azul de Evans a 0,05% em solução salina contendo os diferentes antígenos específicos (1 mg): OVA, farinha do genótipo IT81D 1053, farinha do genótipo BR9 Longá, PLQ Suscetível e PLQ Resistente. Após 30 minutos, os ratos foram sacrificados por inalação com halotano e a pele dissecada para leitura da reação, através da formação de manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais em que havia anticorpos. Cada teste de PCA foi analisado em comparação ao controle que apresentava título de anticorpos previamente determinado, sendo os resultados normalizados nas diversas repetições, de acordo com o título do controle.

6. RESULTADOS

Os resultados foram divididos em duas partes (Parte 1 e Parte 2), na tentativa de facilitar a compreensão do procedimento experimental adotado no presente trabalho. As atividades de pesquisa desenvolvidas foram propostas de modo a responder aos questionamentos feitos.

Na **Parte 1**, as indagações compreenderam:

- Sementes de genótipos de feijão caupi suscetível e resistente ao gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) diferem entre si em seu valor nutricional, quando utilizadas como fonte de proteínas em dietas para animais monogástricos (ratos)?
- Sabendo-se que a metionina é o principal aminoácido limitante no feijão caupi, será que a não suplementação da dieta com esse aminoácido poderia implicar em respostas drásticas, a ponto de mascarar os efeitos deletérios, porventura existentes, provenientes do consumo dos genótipos suscetível ou resistente?

Assim sendo, na parte 1 constam os dados da composição centesimal, análise do perfil eletroforético, detecção e dosagem de proteínas com propriedades antinutricionais e/ou tóxicas e avaliação nutricional das farinhas dos genótipos de feijão caupi, BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao gorgulho respectivamente.

Na **Parte 2**, os questionamentos incluíram:

- Proteínas ligantes à quitina purificadas de sementes de feijão caupi teriam alguma ação deletéria sobre o organismo animal quando incluídas em dietas para ratos em crescimento, a exemplo do que tem sido verificado, em alguns casos com insetos, em particular o gorgulho do feijão caupi?
- Haveria diferenças entre as proteínas ligantes à quitina purificadas de genótipo suscetível ou resistente ao gorgulho no que se refere à sua ação sobre animais monogástricos?

Dessa forma, na parte 2 estão apresentados os resultados dos procedimentos usados para obtenção e caracterização das proteínas ligantes à quitina de ambos os genótipos, suscetível e resistente ao gorgulho. Também, estão inclusos os dados oriundos da avaliação da qualidade nutricional e da biossegurança alimentar dessas proteínas.

6.1. PARTE 1

6.1.1. Composição Centesimal

Na TABELA 3 estão mostrados os valores obtidos nas análises de umidade, proteína, lipídios, cinzas, fibra bruta e carboidratos de farinha das sementes de feijão caupi, dos genótipos suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*. Os teores de umidade, lipídios, cinzas e carboidratos foram similares para ambos os genótipos. As sementes analisadas apresentaram alto teor de proteína, superior a 20%, tendo sido detectada variação significativa entre elas, possuindo o genótipo suscetível (26,61 g/100 g de farinha) o maior conteúdo protéico. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram também verificadas nos conteúdos de fibra bruta, sendo o genótipo resistente mais rico, cujo valor foi em torno de 5,20 g/100 g de farinha.

6.1.2. Comparação dos Perfis Protéicos das Farinhas de Sementes dos Genótipos de Caupi por PAGE-SDS

Os perfis eletroforéticos da farinha de sementes dos genótipos suscetível e resistente ao gorgulho, obtidos por PAGE na presença de SDS e β -mercaptoetanol, não apresentaram diferenças marcantes, com exceção da

TABELA 3. Composição proximal (g/100 g de farinha) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, expressa em percentual de peso seco

Constituinte	Genótipo	
	Suscetível	Resistente
Umidade	9,57 ± 0,08a	9,23 ± 0,58 ^a
Proteína bruta*	26,61 ± 0,30a	23,45 ± 0,12b
Lipídio total	3,30 ± 1,11a	3,89 ± 0,53 ^a
Cinzas	4,15 ± 0,11a	4,52 ± 0,11 ^a
Fibra bruta	4,32 ± 0,18b	5,20 ± 0,03a
Carboidratos [#]	61,62 ± 1,32a	62,94 ± 0,96a

Média de determinações em triplicata. Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente pelo teste T student ($p > 0,05$).

* N x 6,25.

[#] Determinação por diferença.

existência de uma banda mais proeminente logo acima de 29 kDa verificada no genótipo IT81D 1053 (FIGURA 6). Bandas protéicas com massas moleculares relativas na faixa de 21 a 97 kDa foram verificadas nos dois genótipos, se apresentando com maior intensidade aquelas na região em torno de 45 a 66 kDa e uma outra na faixa de 97 kDa.

6.1.3. Detecção e Dosagem de Proteínas com Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas

6.1.3.1. Lectina

A presença de lectina, avaliada através da capacidade do extrato bruto de aglutinar hemácias de coelho, não foi detectada para ambos os genótipos, quando usadas células não tratadas enzimaticamente. Todavia, quando as hemácias foram tratadas com tripsina, atividade hemaglutinante foi observada, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre o genótipo suscetível e resistente ao gorgulho (TABELA 4). Tendo em vista a baixa atividade hemaglutinante encontrada, foi especulado se não seria um processo tempo-dependente, e os resultados apresentados foram mantidos mesmo quando a avaliação foi feita 15 horas após contato do extrato bruto com as hemácias tripsinizadas.

6.1.3.2. Inibidor de Tripsina

Os extratos brutos de ambos os genótipos foram capazes de inibir a tripsina, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores encontrados, sendo a atividade do genótipo resistente superior ao do suscetível (TABELA 4).

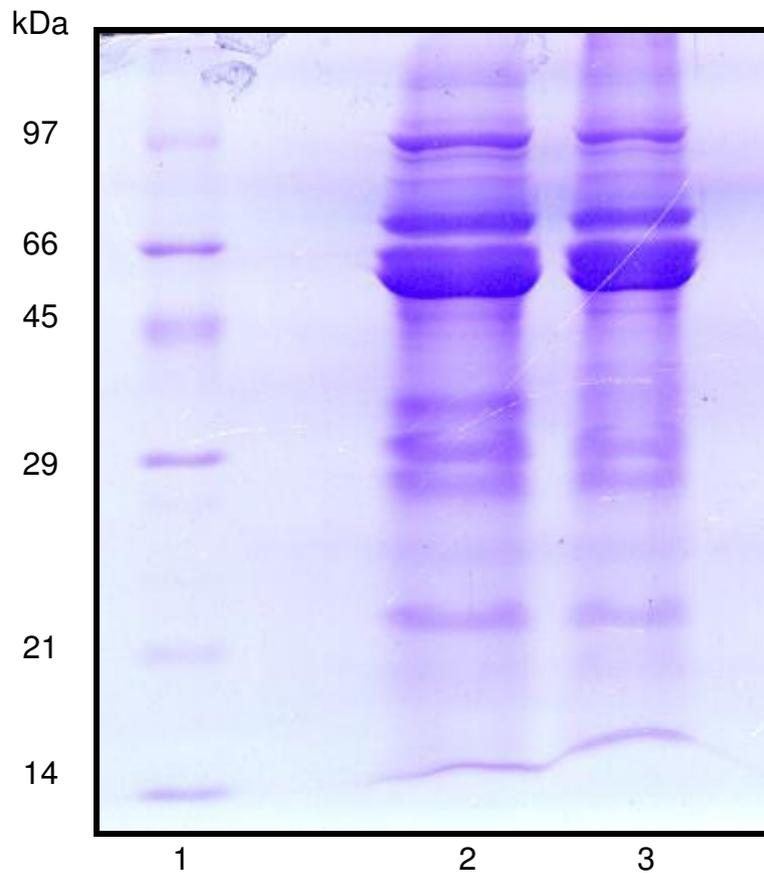


FIGURA 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol da farinha (80 μ gP) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente. (1) Marcadores de massa molecular; (2) farinha de IT81D 1053 e (3) farinha de BR9 Longá.

TABELA 4. Proteínas antinutricionais e/ou tóxicas presentes no extrato bruto de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente

Genótipos	Proteínas antinutricionais e/ou tóxicas		
	Lectina*	Inibidor de tripsina [#]	Urease [§]
Suscetível	0,10 ± 0,04 ^a	12,57 ± 1,4 ^b	25,41 ± 5,4 ^a
Resistente	0,10 ± 0,04 ^a	18,55 ± 0,5 ^a	25,13 ± 5,2 ^a

Média de determinações em triplicata. Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente pelo teste T student ($p > 0,05$).

* A atividade hemaglutinante (UH/mgF) foi expressa como unidades de hemaglutinação (UH) por mg de farinha. Uma UH corresponde ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

[#] A atividade inibidora de tripsina foi expressa em mg de tripsina inibida por g de farinha.

[§] A atividade ureásica foi expressa como unidades de urease por g de farinha. 1 g de urease pura contém 870.000 unidades (Sigma).

6.1.3.3. Urease

Os extratos brutos obtidos a partir dos genótipos estudados apresentaram atividade ureásica, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles (TABELA 4).

6.1.4. Ensaio Biológico I - Avaliação da Qualidade Nutricional das Proteínas de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao *Callosobruchus maculatus* (gorgulho)

6.1.4.1. Curvas de Crescimento, Dieta Ingerida e Ganho ou Perda de Peso Corpóreo

A FIGURA 7 apresenta as curvas de crescimento dos animais durante os dez dias do experimento. Os animais submetidos à dieta com albumina da clara do ovo (dieta padrão) mostraram um desempenho satisfatório, o qual já era esperado, tendo em vista elevada qualidade nutricional dessa fonte protéica de origem animal. Os animais que continham em suas dietas farinha dos genótipos suscetível e resistente ao gorgulho, suplementadas ou não com metionina, apresentaram taxas de crescimento inferiores àqueles que receberam a dieta padrão. Ainda que inferior à dieta padrão, a suplementação com metionina proporcionou um melhor desempenho dos animais em relação à farinha não suplementada. Comparando o genótipo suscetível com o resistente, embora as curvas de crescimento dos animais tenham mostrado perfis semelhantes, mantendo a tendência de inclinação, um desempenho superior foi constatado naqueles cujos tratamentos incluíam farinha do genótipo resistente como fonte de proteínas.

O desempenho inferior dos animais que continham em suas dietas farinha dos genótipos de feijão caupi, em relação ao dos submetidos à dieta

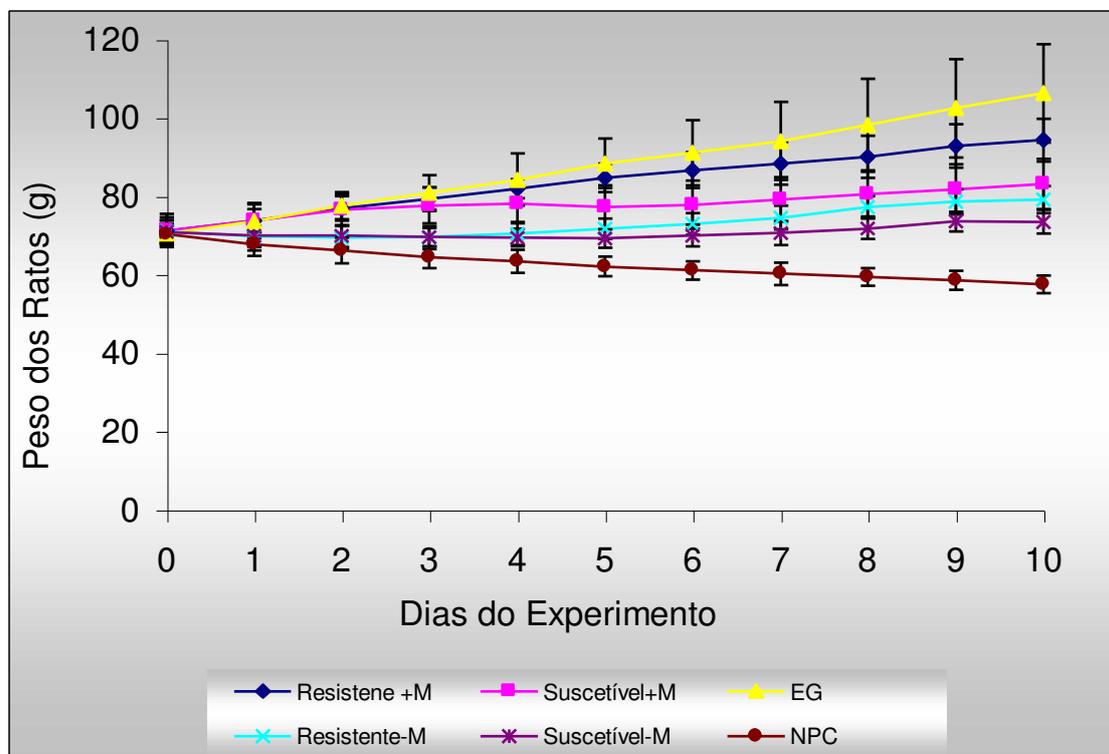


FIGURA 7. Curvas de crescimento dos ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparadas com as curvas de crescimento dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo e dieta isenta de proteínas. Suscetível -M: farinha de BR9 Longá não suplementada com metionina; Suscetível +M: farinha de BR9 Longá suplementada com metionina; Resistente -M: farinha de IT81D 1053 não suplementada com metionina; Resistente +M: farinha de IT81D 1053 suplementada com metionina; EG: Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

padrão, pode ser parcialmente explicado pela quantidade menor de dieta ingerida no decorrer do período experimental. Esse fato foi mais evidente nos tratamentos que continham o genótipo suscetível (FIGURA 8).

A TABELA 5 apresenta os dados de ganho ou perda de pesos calculados através da comparação entre os pesos dos animais no início e no final do experimento. Os animais pertencentes ao grupo alimentado com a dieta padrão exibiram ganho de peso correspondente a 47,82%. Embora inferior ao verificado com a dieta contendo albumina da clara do ovo, mas significativo ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos contendo farinha de feijão caupi, foi o incremento de peso dos animais submetidos ao tratamento contendo o genótipo resistente suplementado com metionina (Resistente +M), cujo valor foi 32,51%. Esse percentual de ganho de peso foi o dobro do verificado com o grupo que recebeu farinha do genótipo suscetível suplementado (Suscetível +M) em sua dieta, cujo valor foi 16,60%. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram também encontradas quando comparados os tratamentos contendo os dois genótipos sem terem sido suplementados. De forma contrária, os animais alimentados com a dieta NPC demonstraram redução de peso da ordem de 18,25%.

6.1.4.2. Balanço de Nitrogênio

Na TABELA 6 estão os parâmetros analisados apenas nos últimos cinco dias do experimento, tais como os dados de ingestão alimentar e de nitrogênio e suas relações com a excreção de matéria fecal e nitrogênio. A ingestão de dieta e, conseqüentemente, o consumo de nitrogênio pelos animais pertencentes aos tratamentos contendo farinha dos genótipos suscetível (32,91 e 0,53 g/rato, respectivamente) e resistente (38,20 e 0,61 g/rato, respectivamente), sem suplementação com metionina, não diferiram significativamente ($p > 0,05$). A suplementação da farinha do genótipo resistente com metionina proporcionou aumento do consumo de dieta e de nitrogênio (48,34 e 0,77 g/rato, respectivamente), tornando os valores similares aos encontrados com a dieta padrão (51,71 e 0,83 g/rato, respectivamente).

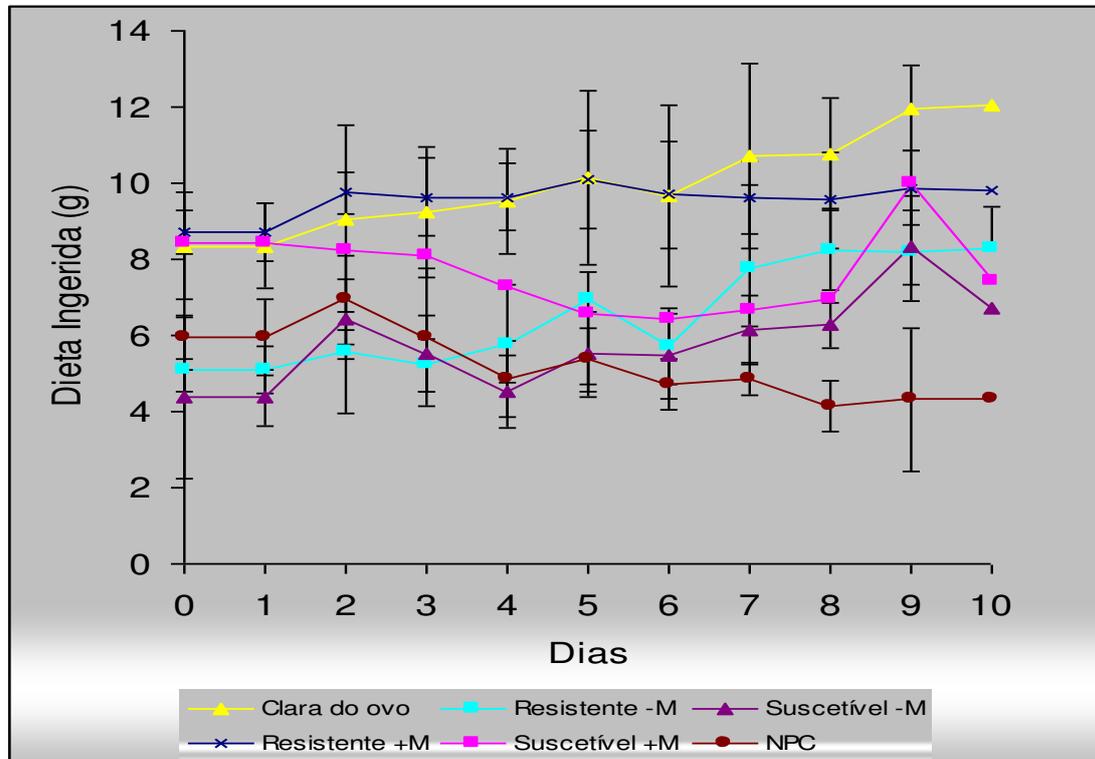


FIGURA 8. Curvas de consumo diário dos ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparadas com as curvas de consumo dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo e dieta isenta de proteínas. Suscetível -M: farinha de BR9 Longá não suplementada com metionina; Suscetível +M: farinha de BR9 Longá suplementada com metionina; Resistente -M: farinha de IT81D 1053 não suplementada com metionina; Resistente +M: farinha de IT81D 1053 suplementada com metionina; EG: Clara de ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aptotéica.

TABELA 5. Ganho ou perda de pesos dos animais alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta isenta de proteínas

Dietas*	Peso Inicial	Peso Final	Percentual de Ganho (+) ou Perda (-) de peso [¶]
EG	70,43 ± 2,22a	104,11 ± 10,67 ^a	+47,82 ± 9,75 ^a
Resistente -M	70,95 ± 2,92a	79,13 ± 3,42cd	+11,53 ± 1,62c
Resistente +M	71,15 ± 3,42a	94,28 ± 5,42b	+32,51 ± 6,18b
Suscetível -M	70,91 ± 3,07a	73,43 ± 3,16d	+3,55 ± 1,57d
Suscetível +M	71,24 ± 4,34a	83,07 ± 6,42c	+16,60 ± 5,95c
NPC	70,19 ± 2,70	57,38 ± 2,24e	-18,25 ± 1,99e

Letras iguais na vertical indicam resultados estatisticamente não diferentes pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* Suscetível -M: farinha de BR9 Longá não suplementada com metionina; Suscetível +M: farinha de BR9 Longá suplementada com metionina; Resistente -M: farinha de IT81D 1053 não suplementada com metionina; Resistente +M: farinha de IT81D 1053 suplementada com metionina; EG: Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

¶ Os percentuais de ganho ou perda de peso foram calculados com base nos pesos dos animais no início e no final do experimento.

TABELA 6. Balanço de nitrogênio dos ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo, calculados para os últimos cinco dias de experimento

Dieta*	Dieta ingerida (D)	Nitrogênio ingerido (N)	Excreção fecal (F)	Nitrogênio fecal (FN)	F/D x 100	FN/N x 100
EG	51,71 ± 9,67a	0,83 ± 0,14a	1,13 ± 0,21c	0,06 ± 0,12c	2,19 ± 0,54c	7,23 ± 1,05c
Resistente -M	38,20 ± 5,68b	0,61 ± 0,10b	3,66 ± 0,49a	0,20 ± 0,02a	9,58 ± 0,81a	32,79 ± 4,20 ^a
Resistente +M	48,34 ± 5,03a	0,77 ± 0,08a	3,78 ± 0,56a	0,19 ± 0,02a	7,82 ± 0,56b	24,68 ± 1,90b
Suscetível -M	32,91 ± 4,25b	0,53 ± 0,08b	3,09 ± 0,28b	0,14 ± 0,02b	9,39 ± 1,05a	26,42 ± 3,98 ^a
Suscetível +M	37,47 ± 7,13b	0,60 ± 0,13b	3,01 ± 0,78b	0,18 ± 0,04a	8,03 ± 1,53a	30,00 ± 3,38 ^a

Valores seguidos por letras iguais na vertical não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* Suscetível -M: farinha de BR9 Longá não suplementada com metionina; Suscetível +M: farinha de BR9 Longá suplementada com metionina; Resistente -M: farinha de IT81D 1053 não suplementada com metionina; Resistente +M: farinha de IT81D 1053 suplementada com metionina e EG: albumina da clara do ovo.

Contrariamente, a suplementação da farinha do genótipo suscetível com metionina não favoreceu a ingestão de dieta e consumo de nitrogênio, mantendo os valores muito próximos aos encontrados com a farinha não suplementada (37,47 e 0,70 g/rato, respectivamente).

A excreção de matéria fecal e de nitrogênio foi maior nos animais que receberam dietas contendo farinha de feijão caupi do que naqueles que consumiram a dieta controle positivo (1,13 e 0,06 g/rato). Entretanto, foram verificadas divergências nos valores quando apreciados os tratamentos contendo os genótipos suscetível e resistente. Considerando apenas farinha de sementes não suplementada, o grupo submetido à dieta contendo o genótipo resistente apresentou maior excreção de matéria e nitrogênio fecal (3,66 e 0,20 g/rato, respectivamente) do que o verificado com o genótipo suscetível (3,09 e 0,14 g/rato, respectivamente). A excreção de matéria fecal e nitrogênio (3,78 e 0,19 g/rato, respectivamente) no tratamento contendo o genótipo resistente foi mantida após suplementação com metionina. Todavia, no genótipo suscetível, após suplementação com metionina, embora a excreção de matéria fecal (3,01 g/rato) não tenha tido alteração significativa ($p > 0,05$), um aumento na eliminação de nitrogênio (0,18 g/rato) foi verificado, atingido os valores verificados com o genótipo resistente.

As relações de excreção fecal e dieta ingerida ($F/D \times 100$) e nitrogênio excretado e nitrogênio ingerido mostraram que os animais alimentados com as dietas contendo o genótipo suscetível ou resistente apresentaram valores bem superiores, em alguns casos cerca de 4,5 vezes, quando comparados aos animais do grupo tido como controle positivo. Apesar dessa variação, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos alimentados com dieta contendo o genótipo suscetível ou resistente, sem suplementação com metionina. A adição de metionina implicou na diminuição desses valores no grupo submetido à dieta com o genótipo resistente, mas não resultou em alterações naquele que continha o genótipo suscetível.

6.1.4.3. Parâmetros Nutricionais

Os valores correspondentes aos parâmetros nutricionais, encontram-se dispostos na TABELA 7. Inicialmente, fica evidenciada a qualidade inferior das dietas à base de farinha dos diferentes genótipos de feijão caupi, comparadas à albumina da clara do ovo, observação esta corroborada pelos baixos valores de NPU (Utilização Líquida de Proteína), digestibilidade e valor biológico.

A digestibilidade da dieta contendo o genótipo suscetível (65,38%) não diferiu significativamente ($p > 0,05$) daquela contendo farinha do genótipo resistente (67,40%). Com a suplementação das dietas através da adição de metionina foi verificada uma tendência de aumento da digestibilidade nos genótipos suscetível (70,23) e resistente (68,50%).

Diferenças significativas ($p > 0,05$) na NPU não foram encontradas quando comparados os tratamentos contendo farinhas do genótipo suscetível (39,78%) ou resistente (39,70%). A adição de metionina às dietas parece ter promovido uma maior retenção das proteínas, particularmente daquelas presentes na dieta contendo o genótipo suscetível (45,93%). Todavia, os valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação às dietas não suplementadas.

As dietas contendo farinha do genótipo suscetível e do resistente apresentaram valor biológico similar. Uma tendência de aumento do valor biológico foi verificada após suplementação com metionina. Todavia, os valores calculados neste último caso não foram significativamente distintos ($p > 0,05$), quando comparados com aqueles das dietas não suplementadas.

6.1.4.4. Alterações Macroscópicas nos Órgãos dos Ratos

Ao final do décimo dia de experimento os ratos foram sacrificados e alguns

TABELA 7. Parâmetros nutricionais obtidos pela alimentação de ratos (n = 6) com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não com metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo

*Dietas	NPU (%)	Digestibilidade (%)	Valor Biológico (%)
Clara do ovo	87,36 ± 8,21a	98,04 ± 1,78 ^a	83,91 ± 5,22 ^a
Resistente -M	39,70 ± 3,44b	67,40 ± 6,04b	59,19 ± 7,63b
Resistente +M	44,24 ± 4,40b	68,50 ± 6,09b	64,41 ± 6,33b
Suscetível -M	39,78 ± 6,36b	65,38 ± 8,72b	60,41 ± 7,39b
Suscetível +M	45,93 ± 4,74b	70,23 ± 5,20b	65,40 ± 7,33b

Valores seguidos por letras iguais na vertical não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* Suscetível -M: farinha de BR9 Longá não suplementada com metionina; Suscetível +M: farinha de BR9 Longá suplementada com metionina; Resistente -M: farinha de IT81D 1053 não suplementada com metionina; Resistente +M: farinha de IT81D 1053 suplementada com metionina e Clara do ovo: albumina da clara do ovo.

órgãos, como pâncreas, fígado, timo, baço, estômago, intestino delgado, intestino grosso, coração, pulmão e rins, foram retirados e analisados seus respectivos pesos secos (TABELAS 8 e 9). Em comparação com órgãos internos dos animais pertencentes ao grupo mantido com a dieta à base de clara de ovo, foi verificado que, em geral, dietas contendo farinha de feijão caupi não induziram alterações na maioria dos órgãos analisados. Entretanto, foi observada hipertrofia do pâncreas e intestino grosso, presente tanto no tratamento com o genótipo suscetível, como no resistente. Com a suplementação com metionina, ainda que os pesos do intestino grosso não tenham sido significativamente diferentes ($p > 0,05$) do verificado com as dietas não suplementadas, foi verificada uma tendência de redução da hipertrofia relatada. Os animais que receberam a dieta aprotéica apresentaram maior peso relativo de alguns órgãos, como pulmões e coração, e atrofia do baço.

TABELA 8. Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) de órgãos tubulares e glândulas anexas do sistema digestório de ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não com metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica

Órgãos	Dietas*					
	Clara do ovo	Resistente -M	Resistente +M	Suscetível -M	Suscetível +M	NPC
Pâncreas	0,13 ± 0,03b	0,25 ± 0,06a	0,24 ± 0,06a	0,24 ± 0,06a	0,23 ± 0,07a	0,13 ± 0,04b
Fígado	3,62 ± 0,65a	3,62 ± 0,36a	4,04 ± 0,49a	3,49 ± 0,31a	4,14 ± 0,51a	3,69 ± 0,26a
Estômago	0,45 ± 0,09a	0,51 ± 0,06a	0,48 ± 0,10a	0,50 ± 0,05a	0,55 ± 0,05a	0,47 ± 0,03a
Intestino delgado	2,16 ± 0,12a	2,43 ± 0,26a	2,39 ± 0,32a	2,36 ± 0,44a	2,33 ± 0,25a	2,13 ± 0,18a
Intestino grosso	0,55 ± 0,11c	0,84 ± 0,10a	0,75 ± 0,22ab	0,88 ± 0,10a	0,75 ± 0,12ab	0,64 ± 0,22bc

Valores seguidos por letras iguais na horizontal não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p < 0,05$).

* Suscetível -M: farinha de BR9 Longá não suplementada com metionina; Suscetível +M: farinha de BR9 Longá suplementada com metionina; Resistente -M: farinha de IT81D 1053 não suplementada com metionina; Resistente +M: farinha de IT81D 1053 suplementada com metionina; Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

TABELA 9. Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) do coração, rins, pulmões e órgãos linfóides de ratos (n = 6) alimentados com dietas à base de farinha de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, suplementada ou não metionina, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica

Órgãos	Dietas*					
	Clara do ovo	Resistente -M	Resistente +M	Suscetível -M	Suscetível +M	NPC
Coração	0,24 ± 0,05b	0,28 ± 0,03ab	0,25 ± 0,03b	0,27 ± 0,03ab	0,27 ± 0,03ab	0,31 ± 0,03a
Rins	0,74 ± 0,13a	0,76 ± 0,07a	0,72 ± 0,10a	0,82 ± 0,11a	0,85 ± 0,10a	0,86 ± 0,05a
Pulmões	0,36 ± 0,04b	0,43 ± 0,02ab	0,38 ± 0,06b	0,42 ± 0,05ab	0,44 ± 0,05ab	0,48 ± 0,03a
Timo	0,19 ± 0,04ab	0,19 ± 0,02ab	0,20 ± 0,04a	0,18 ± 0,03ab	0,22 ± 0,07a	0,14 ± 0,03b
Baço	0,17 ± 0,03a	0,16 ± 0,01ab	0,15 ± 0,03ab	0,16 ± 0,03ab	0,16 ± 0,01ab	0,13 ± 0,01b

Valores seguidos por letras iguais na horizontal não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* Suscetível -M: farinha de BR9 Longá não suplementada com metionina; Suscetível +M: farinha de BR9 Longá suplementada com metionina; Resistente -M: farinha de IT81D 1053 não suplementada com metionina; Resistente +M: farinha de IT81D 1053 suplementada com metionina; Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

6.2. PARTE 2

6.2.1. Obtenção das Proteínas Ligantes à Quitina

A aplicação do extrato bruto de ambos os genótipos estudados em coluna de quitina rendeu duas frações protéicas bem definidas (FIGURAS 9 e 10). Uma delas foi obtida pela percolação da coluna com o próprio tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5). A outra fração, que interagiu com o polímero de quitina, foi eluída com solução de ácido acético 0,02 M. As proteínas ligantes à quitina dos genótipos BR9 Longá, e IT81D 1053, suscetível e resistente ao gorgulho do feijão caupi, respectivamente, foram denominadas de PLQ suscetível e PLQ resistente, sendo doravante assim referidas no presente trabalho. A metodologia utilizada para obtenção das proteínas ligantes à quitina demonstrou ser bastante eficaz, permitindo que, em cada procedimento de purificação fossem obtidos quantitativos dessas proteínas em torno de 0,87 mg (genótipo suscetível) e 0,98 mg (genótipo resistente), que correspondem a 34,8% e 39,2%, respectivamente, do total de proteína aplicada. O perfil eletroforético dessas proteínas está apresentado na FIGURA 11, predominando bandas protéicas com massa molecular aparente na região de 60 kDa. No genótipo resistente, além de bandas nesta região, destacam-se outras na faixa de 30 kDa.

6.2.2. Avaliação da Digestibilidade *In vitro* das PLQ

PLQ Suscetível e PLQ Resistente quando incubadas com pepsina por até 6 horas não sofreram, aparentemente, nenhum tipo de hidrólise, ao contrário do observado para a BSA que foi totalmente digerida nos primeiros 30 minutos de incubação (FIGURAS 12 e 13, Pepsina). Por outro lado, com

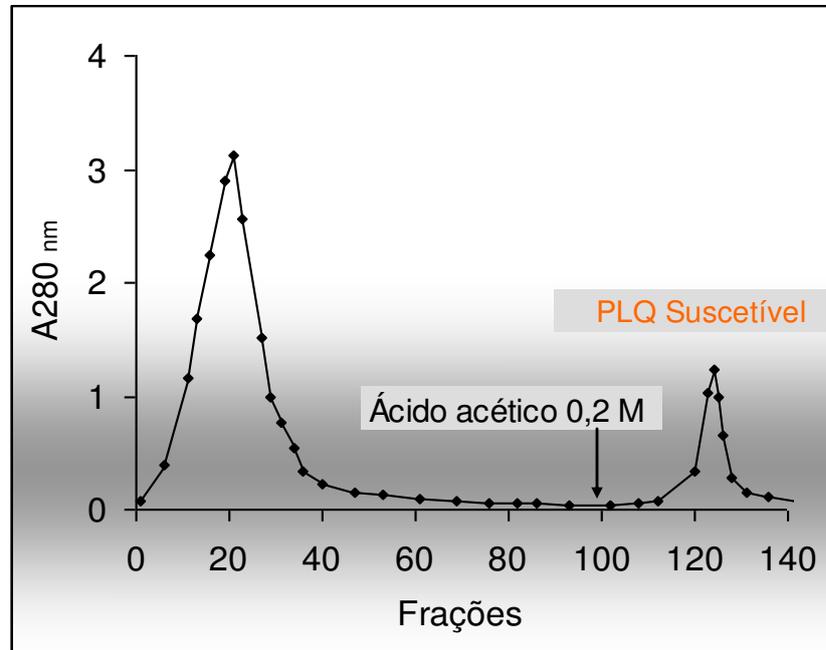


FIGURA 9. Cromatografia de afinidade em coluna de quitina. Extrato bruto (250 mgP) do genótipo suscetível (BR9 Longá) foi aplicado em coluna de quitina (27,1 x 3,1 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5. As proteínas foram eluídas com ácido acético 0,2 M. Fluxo da coluna: 100 mL/ h; Fração: 5 mL/ tubo. Proteína retida: 0,87 mg.

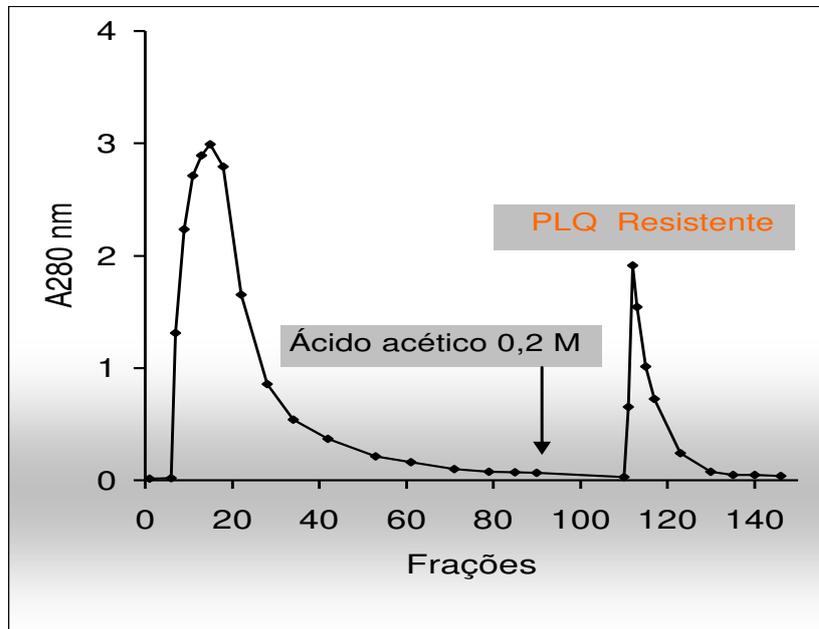


FIGURA 10. Cromatografia de afinidade em coluna de quitina. Extrato bruto (250 mgP) do genótipo resistente (IT81D 1053) foi aplicado em coluna de quitina (27,1 x 3,1 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5. As proteínas foram eluídas com ácido acético 0,2 M. Fluxo da coluna: 100 mL/h; Fração: 5 mL/tubo. Proteína retida: 0,98 mg.

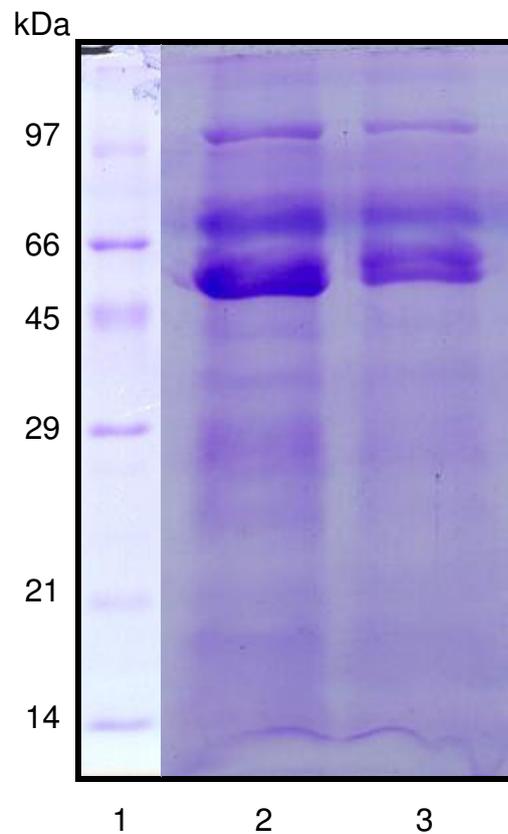


FIGURA 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol da farinha (80 μ gP) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente. (1) Marcadores de massa molecular; (2) proteínas ligantes à quitina de IT81D 1053; (3) proteínas ligantes à quitina de BR9 longá.

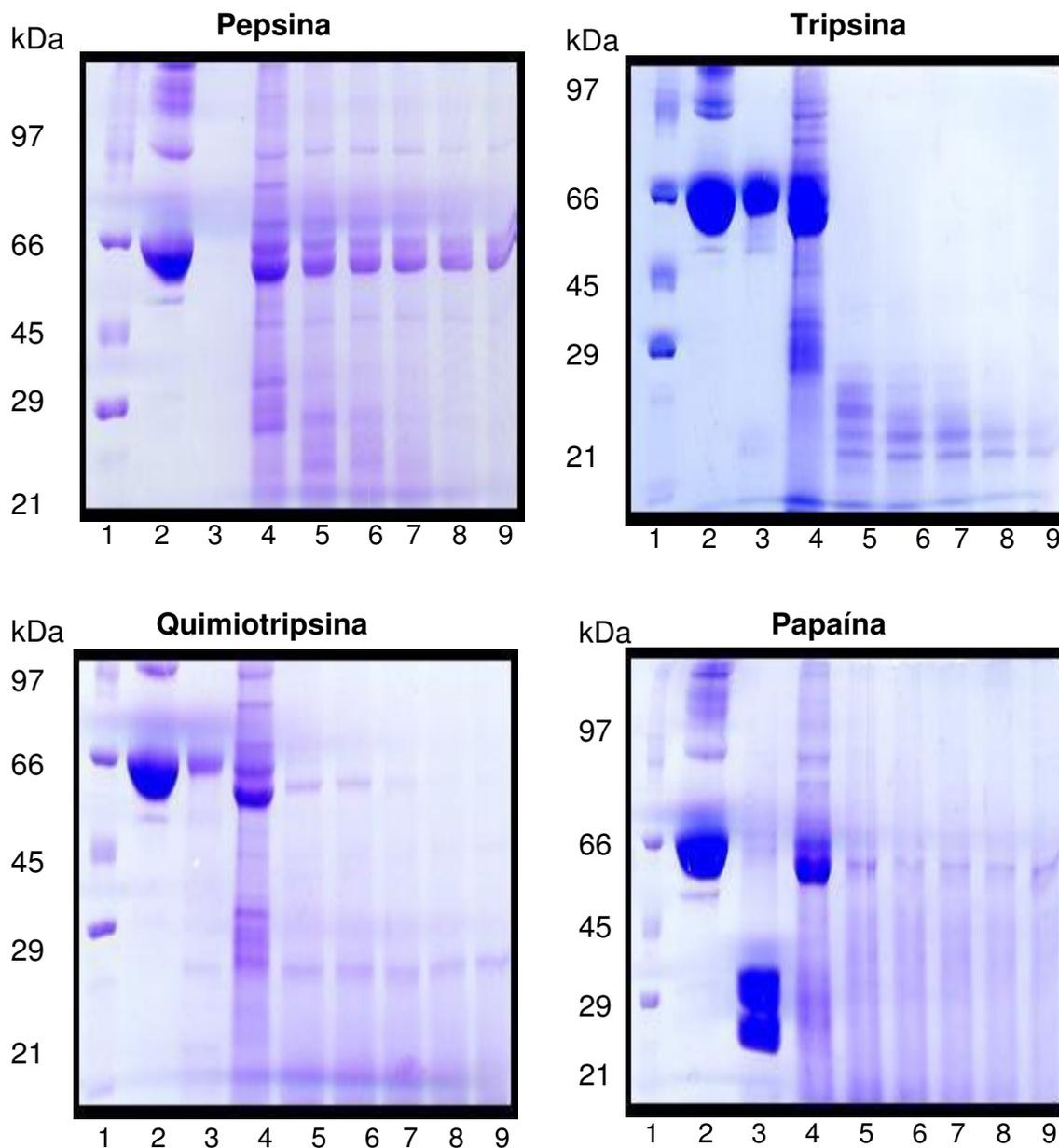


FIGURA 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina, BSA (controle) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo BR9 Longá (PLQ suscetível), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro*, com pepsina, tripsina, quimiotripsina e papaína nos períodos de tempo: 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas. 1 - marcador de massa molecular; 2 - BSA não tratada enzimaticamente; 3 - BSA tratada enzimaticamente durante 0,5 horas; 4 - PLQ não tratada enzimaticamente; 5, 6, 7, 8 e 9 - PLQ tratada enzimaticamente por 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas, respectivamente. Proteína aplicada: 50 μ g.

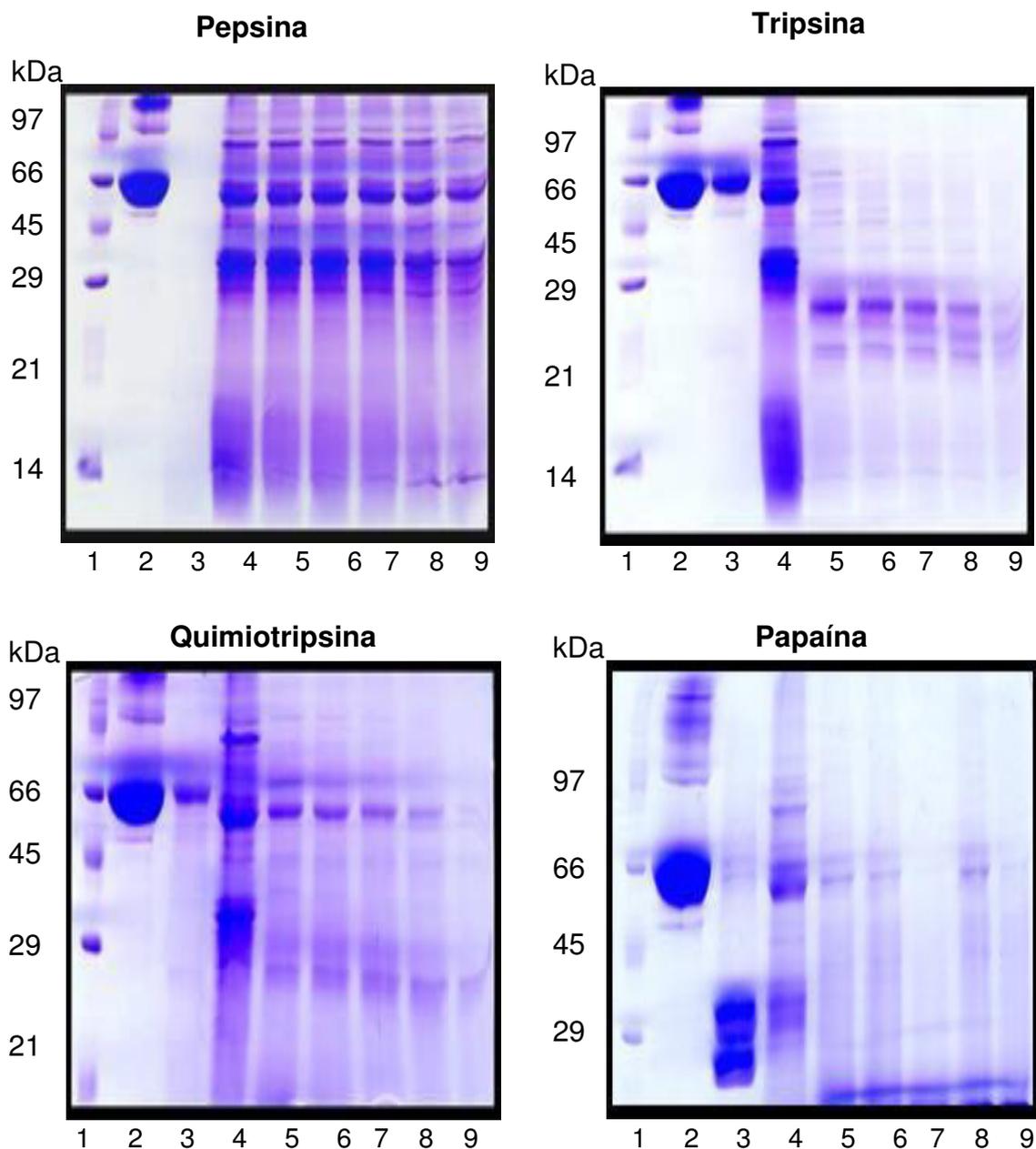


FIGURA 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina, BSA (controle) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo IT81D 1053 (PLQ resistente), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro* com pepsina, tripsina, quimiotripsina e papaína nos seguintes períodos de tempo: 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas. 1 - marcador de massa molecular; 2 - BSA não tratada enzimaticamente; 3 - BSA tratada enzimaticamente durante 0,5 horas; 4 - PLQ não tratada enzimaticamente; 5, 6, 7, 8 e 9 - PLQ tratada enzimaticamente por 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas, respectivamente. Proteína aplicada: 50 μ g.

tripsina e quimiotripsina, PLQ dos genótipos suscetível e resistente foram hidrolisadas. Todavia, PLQ Resistente parece ter sido mais resistente à ação enzimática dessas enzimas do que PLQ Suscetível (FIGURAS 12 e 13, Tripsina e Quimiotripsina), desde que os perfis eletroforéticos foram praticamente o mesmo quando considerada incubação por 30 minutos ou 4 horas. Apenas após 6 horas de incubação com tripsina ou quimiotripsina, foi verificada uma nítida redução na intensidade das bandas protéicas, ou mesmo ausência de algumas delas, nas PLQ Resistente. Já nas PLQ Suscetível, alterações na distribuição e intensidade das bandas se tornaram perceptíveis já nas primeiras horas de incubação das proteínas com as enzimas tripsina e quimiotripsina.

Quando analisado o comportamento das bandas protéicas das PLQ frente à incubação com papaína, exemplo de proteinase cisteínica, uma classe de enzimas característica do trato digestório do inseto *Callosobruchus maculatus*, foi observada hidrólise (FIGURAS 12 e 13, Papaína). Essa hidrólise foi bem mais evidente com as PLQ Suscetível.

Na simulação da digestão usando várias enzimas em seqüência, em primeiro a pepsina, seguida de tripsina e quimiotripsina, foi evidenciada conservação das bandas protéicas após incubação das PLQ com pepsina, quer do genótipo suscetível, quer do resistente, mesmo após 3 horas de contato (FIGURAS 14 e 15). Entretanto, digestão completa foi obtida após adição de tripsina e quimiotripsina, sendo esta visualizada mais precocemente nas PLQ Suscetível (FIGURA 14).

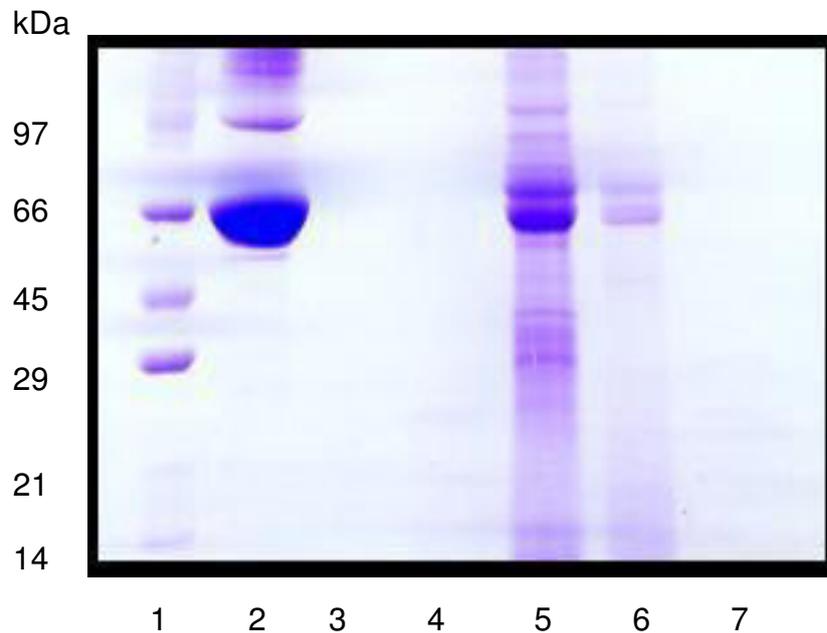


FIGURA 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina (BSA) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo BR9 Longá (PLQ suscetível), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro* com pepsina (3 horas), seguida de tripsina e quimiotripsina (2 horas). 1 - marcador de massa molecular; 2 - BSA não tratada enzimaticamente; 3 - BSA após incubação com pepsina; 4 - BSA após incubação com pepsina, tripsina e quimiotripsina; 5 - PLQ não tratada enzimaticamente; 6 - PLQ após incubação com pepsina e 7 - PLQ após incubação com pepsina, tripsina e quimiotripsina.

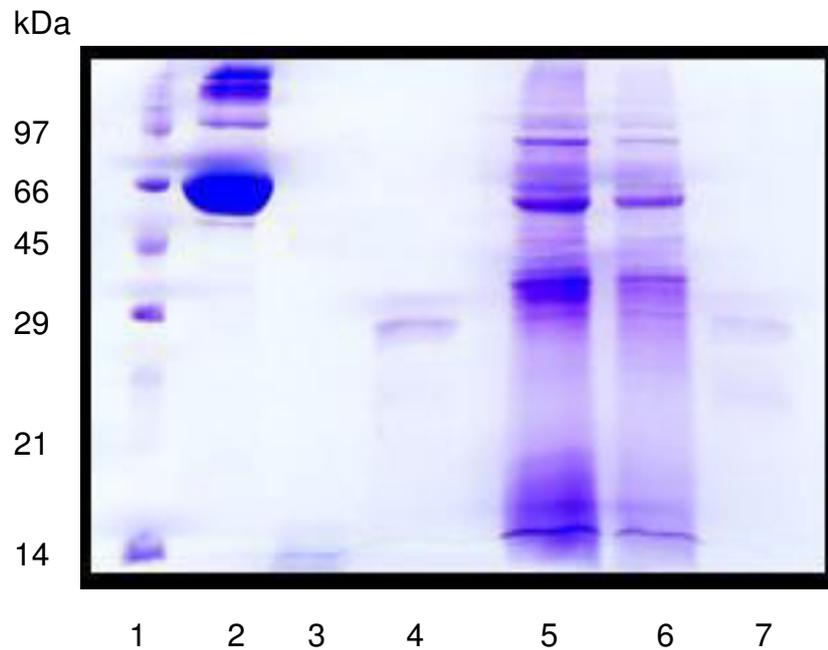


FIGURA 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS da albumina sérica bovina (BSA) e das proteínas ligantes à quitina do genótipo IT81D 1053 (PLQ resistente), submetidas ao tratamento enzimático *in vitro* com pepsina (3 horas), seguida de tripsina e quimiotripsina (2 horas). 1 - marcador de massa molecular; 2 - BSA não tratada enzimaticamente; 3 - BSA após incubação com pepsina; 4 - BSA após incubação com pepsina, tripsina e quimiotripsina; 5 - PLQ não tratada enzimaticamente; 6 - PLQ após incubação com pepsina e 7 - PLQ após incubação com pepsina, tripsina e quimiotripsina.

6.2.3. Ensaio Biológico II - Avaliação das Propriedades Antinutricionais e/ou Tóxicas das Proteínas Ligantes à Quitina (PLQ) de Sementes de Genótipos de Feijão caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao *Callosobruchus maculatus* (gorgulho)

6.2.3.1. Curvas de Crescimento, Dieta Ingerida e Ganho ou Perda de Peso Corpóreo

Os resultados do ensaio biológico visando à avaliação das propriedades antinutricionais e/ou tóxicas das proteínas ligantes à quitina de genótipos suscetível e resistente ao gorgulho do feijão caupi demonstraram que, em geral, essas proteínas não induziram diferenças significativas, em relação ao grupo que recebeu albumina da clara do ovo como única fonte de proteína (controle).

A FIGURA 16 apresenta as curvas de crescimento dos animais durante os dez dias do experimento. As curvas de crescimento dos animais submetidos aos tratamentos contendo as PLQ foram aparentemente superiores ao controle. Entretanto, diferenças significativas entre as médias de peso dos animais apenas foram observadas nos últimos dias, quando considerados o tratamento contendo PLQ Resistente e o grupo controle. Os animais submetidos às dietas contendo PLQ Suscetível e PLQ Resistente mostraram curvas de crescimento semelhantes.

O excelente desempenho dos animais observados com as proteínas teste pode ser explicado pelo consumo diário de dieta, próximo ao do grupo controle (FIGURA 17). De forma mais precisa, os animais pertencentes ao tratamento contendo PLQ Resistente apresentaram maior consumo no decorrer do período experimental em relação àqueles do grupo controle, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados aos submetidos à dieta contendo PLQ Suscetível.

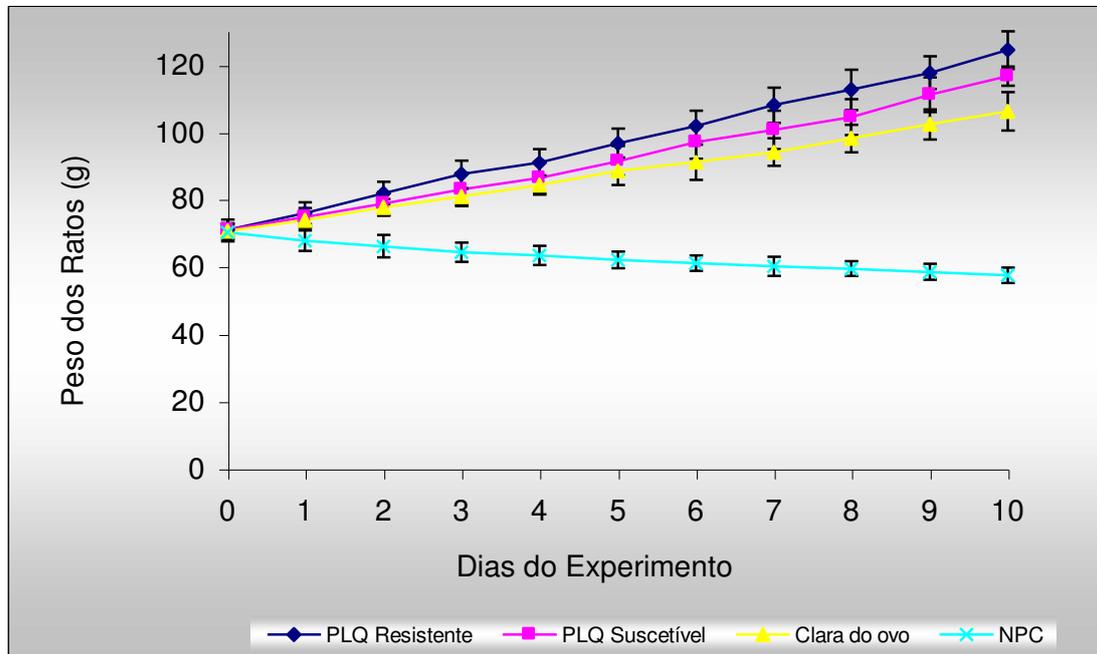


FIGURA 16. Curvas de crescimento dos ratos ($n = 4$) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ), genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparadas com as curvas de crescimento dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo (clara do ovo) e dieta isenta de proteínas (NPC).

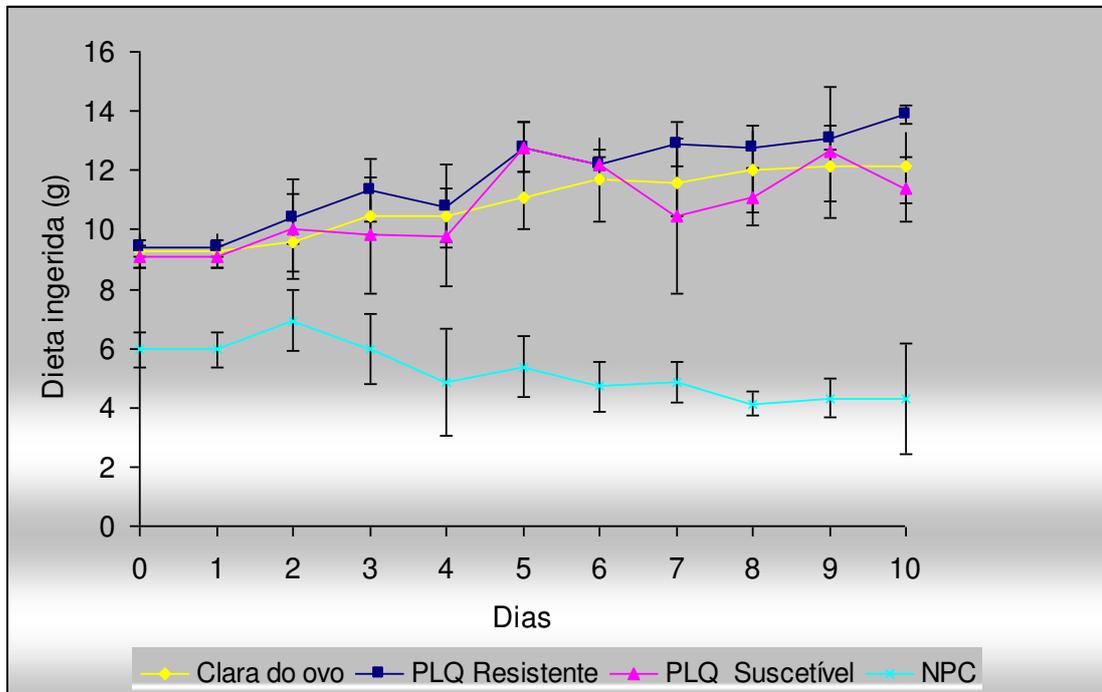


FIGURA 17. Curvas de consumo diário dos ratos ($n = 4$) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ), genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparadas com as curvas de crescimento dos ratos alimentados com a dieta contendo albumina da clara de ovo (clara do ovo) e dieta isenta de proteínas (NPC).

A TABELA 10 mostra os dados de ganho ou perda de pesos relativos, calculados através da comparação entre os pesos dos animais no início e no final do experimento. Os animais alimentados com dietas contendo PLQ Suscetível e Resistente apresentaram incrementos de pesos similar ou superior ao do grupo controle (64,65%). O percentual de ganho de peso verificado para o grupo contendo PLQ Resistente correspondeu a 75,40%, um valor significativamente maior ($p < 0,05$) ao do grupo controle. O grupo alimentado com PLQ Suscetível apresentou valor de 69,11%, similar ao do controle, que embora numericamente menor ao verificado para o grupo contendo PLQ Resistente, não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$). Os animais alimentados com a dieta aprotéica demonstraram redução de peso correspondente a 19,08%.

6.2.3.2. Balanço de Nitrogênio

Os dados obtidos para dieta ingerida, nitrogênio consumido, excreção fecal e nitrogênio excretado encontram-se descritos na TABELA 11.

Os animais que tiveram maior ingestão de dieta durante os cinco últimos dias foram aqueles cuja PLQ Resistente (64,87 g/rato) foram incorporadas à dieta, sendo similar ao do grupo contendo PLQ Suscetível (59,53 g/rato) e superior ao do controle (57,75 g/rato). O consumo de dieta pelos animais que consumiram PLQ Suscetível embora tenha sido numericamente maior do que o verificado para o grupo controle, os valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Em consonância com a quantidade de dieta ingerida, o maior consumo de nitrogênio foi dado pelo grupo contendo PLQ Resistente (0,65 g/rato) que, por sua vez, foi similar ao do grupo alimentado com PLQ Suscetível (0,60 g/rato) e superior ao controle (0,58 g/rato).

Os animais constituintes dos grupos alimentados com as dietas contendo respectivamente PLQ susceptível e resistente apresentaram excreção fecal significativamente superior ($p < 0,05$) à observada pelo grupo

TABELA 10. Ganho ou perda de pesos dos animais alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo e dieta isenta de proteínas

Dietas*	Peso Inicial	Peso Final	Percentual de Ganho (+) ou Perda (-) de peso [¶]
Clara do ovo	70,91 ± 2,96a	116,75 ± 2,83b	+64,65 ± 5,23b
PLQ Suscetível	70,94 ± 2,04a	119,97 ± 5,67ab	+69,11 ± 6,18ab
PLQ Resistente	70,92 ± 1,85a	124,40 ± 5,65a	+75,40 ± 5,15 ^a
NPC	70,91 ± 2,27a	57,38 ± 2,24c	-19,08 ± 1,99c

Letras iguais na vertical indicam resultados estatisticamente não diferentes pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* PLQ Suscetível: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo BR9 Longá; PLQ Resistente: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo IT81D 1053; Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

[¶] Os percentuais de ganho ou perda de peso foram calculados com base nos pesos dos animais no início e no final do experimento

TABELA 11. Balanço de nitrogênio dos ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo, calculados para os últimos cinco dias de experimento

Dieta*	Dieta ingerida (D)	Nitrogênio ingerido (N)	Excreção fecal (F)	Nitrogênio fecal (FN)	F/D x 100	FN/N x 100
Clara do ovo	57,75 ± 3,22b	0,58 ± 0,32b	1,09 ± 0,21b	0,07 ± 0,01a	1,89 ± 0,04b	12,07 ± 0,69 ^a
PLQ Suscetível	59,53 ± 5,07ab	0,60 ± 0,51ab	1,59 ± 0,26a	0,06 ± 0,01a	2,67 ± 0,08a	10,04 ± 0,44b
PLQ Resistente	64,87 ± 1,82 ^a	0,65 ± 0,18 ^a	1,86 ± 0,25a	0,07 ± 0,01a	2,88 ± 0,14a	10,77 ± 0,97ab

Valores seguidos por letras iguais na vertical não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* PLQ Suscetível: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo BR9 Longá; PLQ Resistente: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo IT81D 1053 e Clara do ovo: albumina da clara do ovo.

controle. Apesar das diferenças no conteúdo de matéria excretada, os valores de nitrogênio fecal não diferiram entre os diferentes grupos experimentais.

A relação entre os quantitativos de fezes excretadas e dieta ingerida ($F/D \times 100$) mostra valores ligeiramente superiores para os grupos alimentados com as PLQ em relação ao controle (1,89 g/rato), não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre os que continham em sua dieta PLQ Suscetível (2,67 g/rato) ou PLQ resistente (2,88 g/rato). O quociente nitrogênio excretado/nitrogênio ingerido ($FN/N \times 100$) foi baixo em todos os tratamentos. Porém, para os animais alimentados com as PLQ (10,04 e 10,77 g/rato), os valores foram ainda mais inferiores do que o apresentado pelo grupo controle (12,07 g/rato), demonstrando o bom aproveitamento das proteínas.

6.2.3.3. Parâmetros Nutricionais

Os cálculos de NPU (Utilização Líquida de Proteínas), digestibilidade e valor biológico estão dispostos na TABELA 12, de onde podem ser extraídas algumas observações importantes. Inicialmente, ficam evidenciadas as propriedades não antinutricionais das PLQ, observação corroborada pelos elevados valores de NPU e digestibilidade e, conseqüentemente, de valor biológico, similares àqueles apresentados por animais do grupo controle. Com relação às PLQ, ressalta-se, também, que embora as purificadas de genótipo resistente apresentem propriedades diferenciadas frente ao gorgulho quando comparadas àquelas de genótipo suscetível, em ratos isso não é confirmado, pois as respostas não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em todos os parâmetros analisados.

TABELA 12. Parâmetros nutricionais obtidos pela alimentação de ratos (n = 4) com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara do ovo

*Dietas	NPU (%)	Digestibilidade (%)	Valor Biológico (%)
Clara do ovo	88,19 ± 5,40a	98,68 ± 0,81 ^a	89,30 ± 4,86a
PLQ Suscetível	89,66 ± 8,30a	99,29 ± 0,57 ^a	90,32 ± 8,67a
PLQ Resistente	84,68 ± 5,35a	98,93 ± 0,96 ^a	85,56 ± 4,68a

Valores seguidos por letras iguais na vertical não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* PLQ Suscetível: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo BR9 Longá; PLQ Resistente: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo IT81D 1053; Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

6.2.3.4. Alterações Macroscópicas nos Órgãos dos Ratos

Os resultados discriminados nas TABELAS 13 e 14, referentes aos pesos secos relativos de alguns órgãos internos dos animais submetidos às diferentes condições alimentares, demonstram que as PLQ não influenciaram no desenvolvimento dos órgãos analisados, visto que não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle. Em adição, alterações nos pesos dos órgãos que pudessem ser correlacionadas ao consumo das PLQ oriundas do genótipo suscetível ou resistente não foram observadas, visto que os valores detectados para ambos os grupos são semelhantes. Porém, ressalta-se que no grupo submetido à dieta aprotéica algumas alterações foram detectadas, incluindo hipertrofia do estômago, intestino grosso, rins, coração e pulmões e, também, atrofia do timo. Parece, todavia, que essas alterações são influenciadas pela ingestão de dieta deficiente em proteínas, fato este que pode ser corroborado pela constatação dessas observações apenas no grupo submetido à dieta aprotéica.

6.2.3.5. Análises Histológicas e Morfométricas

Cortes histológicos de segmentos do duodeno e do jejuno dos ratos alimentados com as frações PLQ Suscetível e PLQ Resistente foram analisados e comparados com os mesmos segmentos retirados de animais alimentados com a dieta controle. Nenhuma alteração foi observada. As vilosidades foram encontradas intactas, sem deformidade ou descamação, tanto na região do duodeno bem como no jejuno, semelhante ao controle (FIGURAS 18 e 19). Aumento no número de células não foi observado na região dos vilos, que pudesse indicar modificação patológica causada pela ingestão das proteínas ligantes à quitina. A borda em escova dos vilos se mostrou bem visível, denotando a manutenção de sua integridade. Diminuição

TABELA 13. Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) de órgãos tubulares e glândulas anexas do sistema digestório de ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica

Órgãos	Dietas*			
	Clara do ovo	PLQ Suscetível	PLQ Resistente	NPC
Pâncreas	0,19 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,07 ^a	0,18 ± 0,05 ^a	0,13 ± 0,04 ^a
Fígado	3,53 ± 0,34 ^a	3,30 ± 0,64 ^a	3,69 ± 0,40 ^a	3,19 ± 1,25 ^a
Estômago	0,39 ± 0,05 ^b	0,39 ± 0,05 ^b	0,39 ± 0,02 ^b	0,47 ± 0,03 ^a
Intestino delgado	1,83 ± 0,13 ^a	2,08 ± 0,37 ^a	2,09 ± 0,24 ^a	2,13 ± 0,18 ^a
Intestino grosso	0,44 ± 0,09 ^b	0,52 ± 0,13 ^{ab}	0,46 ± 0,12 ^b	0,64 ± 0,04 ^a

Valores seguidos por letras iguais na horizontal não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* PLQ Suscetível: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo BR9 Longá; PLQ Resistente: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo IT81D 1053; Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

TABELA 14. Peso seco relativo (g/100 g de peso corpóreo) do coração, rins, pulmões e órgãos linfóides de ratos (n = 4) alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com os tratamentos contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo e dieta aprotéica

Órgãos	Dietas*			
	Clara do ovo	PLQ Suscetível	PLQ Resistente	NPC
Coração	0,23 ± 0,04b	0,23 ± 0,03b	0,22 ± 0,02b	0,31 ± 0,03a
Rins	0,57 ± 0,06b	0,58 ± 0,07b	0,55 ± 0,08b	0,86 ± 0,05a
Pulmões	0,36 ± 0,06b	0,33 ± 0,03b	0,32 ± 0,04b	0,48 ± 0,03a
Timo	0,18 ± 0,03ab	0,21 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,02ab	0,14 ± 0,03b
Baço	0,15 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,02a

Valores seguidos por letras iguais na horizontal não diferem significativamente pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

* PLQ Suscetível: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo BR9 Longá; PLQ Resistente: proteínas ligantes à quitina de sementes do genótipo IT81D 1053; Clara do ovo: albumina da clara do ovo e NPC: dieta aprotéica.

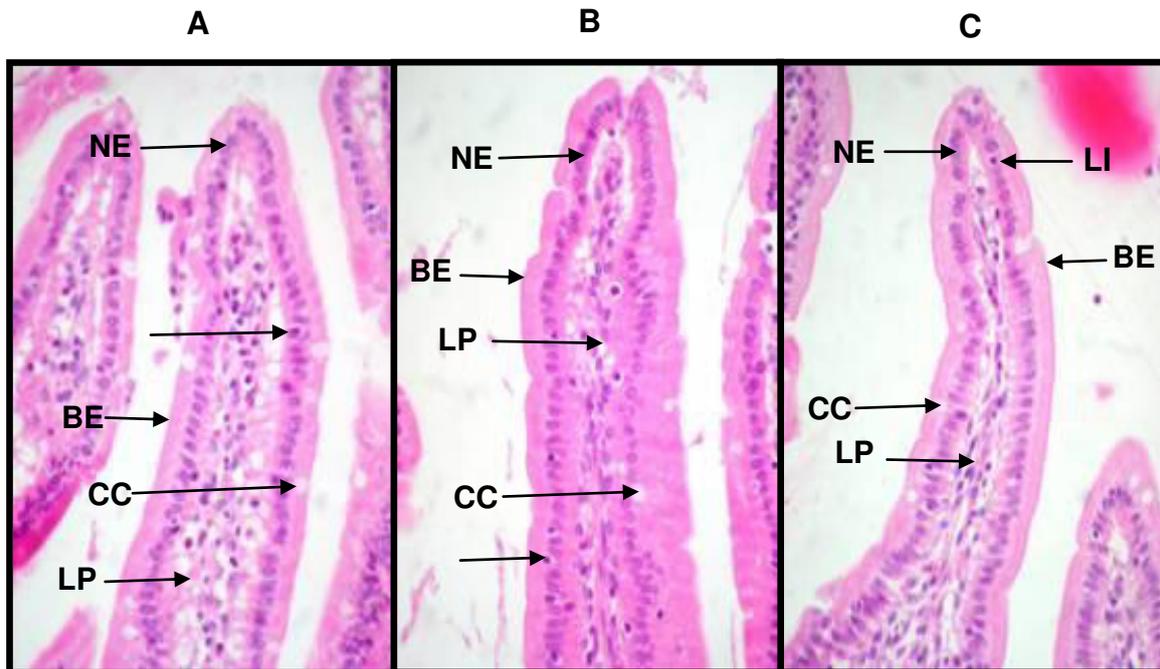


FIGURA 18. Cortes do duodeno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle). A) Vilosidade duodenal dos ratos do grupo controle; B) Vilosidade duodenal dos ratos alimentados com PLQ Resistente; C) Vilosidade duodenal dos ratos alimentados com PLQ Suscetível. LI – Linfócito intraepitelial; NE – Núcleo do enterócito; CC – Célula caliciforme; BE – Borda em escova; LP – Lâmina própria e CR – Célula de reserva.

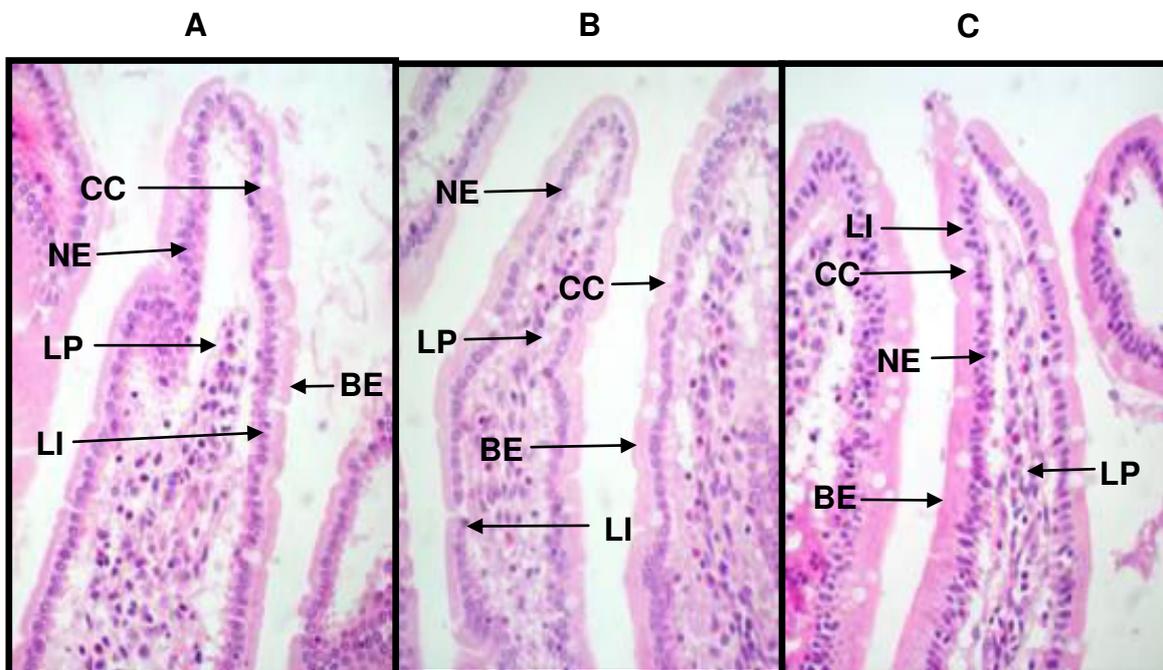


FIGURA 19. Cortes do jejuno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle). A) Vilosidade duodenal dos ratos do grupo controle; B) Vilosidade duodenal dos ratos alimentados com PLQ Resistente; C) Vilosidade duodenal dos ratos alimentados com PLQ Suscetível. LI – Linfócito intraepitelial; NE – Núcleo do enterócito; CC – Célula caliciforme; BE – Borda em escova; LP – Lâmina própria e CR – Célula de reserva.

na altura das vilosidades também não foi observada nos segmentos analisados. As criptas duodenais e do jejuno também foram analisadas (FIGURAS 20 e 21) não mostrando alteração visível. Nenhuma divisão desordenada foi observada nas células de reposição.

O exame morfométrico abrangeu apenas cortes do intestino delgado, subdividido em duodeno e jejuno. As FIGURAS 22, 23 e 24 apresentam os gráficos correspondentes aos resultados dos parâmetros analisados, a saber: altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilosidade/cripta. Os animais submetidos às dietas contendo PLQ Suscetível e PLQ Resistente não apresentaram diminuição de vilosidades e nem aumento na profundidade das criptas quando comparados àqueles do grupo controle. Divergências também não foram encontradas quando comparados entre si os animais dos grupos contendo PLQ Suscetível e PLQ Resistente. Dessa forma, os dados relativos à razão vilosidade/cripta foram similares aos índices observados para o controle.

6.2.4. Ensaio Biológico III - Avaliação da Alergenicidade das Proteínas de Sementes de Genótipos de Feijão Caupi Suscetível (BR9 Longá) e Resistente (IT81D 1053) ao *Callosobruchus maculatus* (gorgulho)

A FIGURA 25 mostra que não houve síntese de IgE-específica quando camundongos foram imunizados por via oral com farinhas dos genótipos de feijão caupi suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus* e suas respectivas PLQ. Os animais imunizados com ovalbumina (controle) não apresentaram, também, síntese de IgE até o 14º dia após imunização.

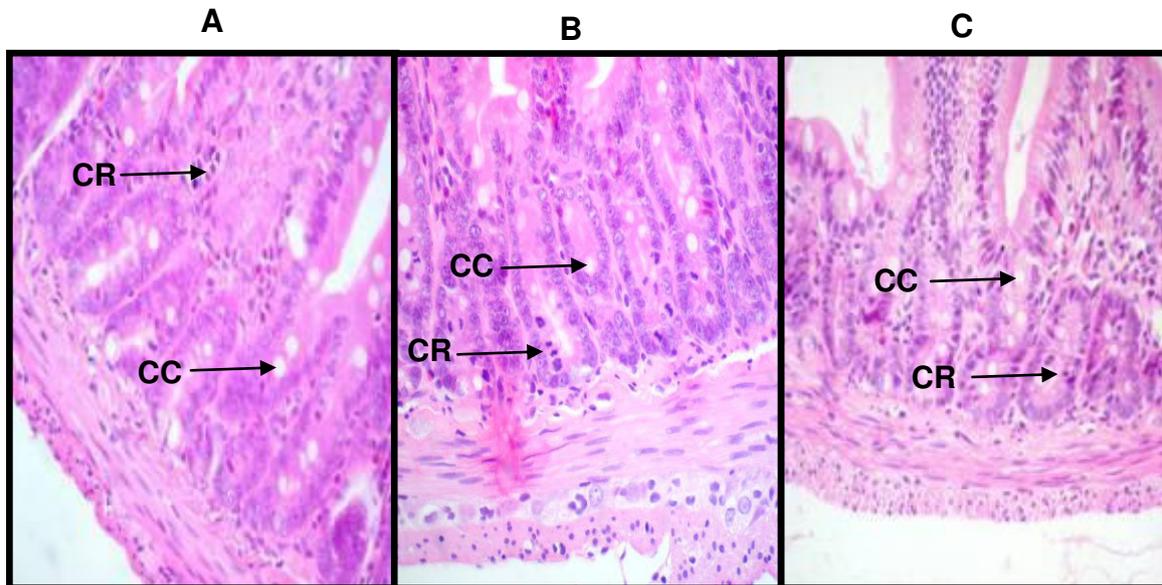


FIGURA 20. Cortes do duodeno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle). A) Cripta duodenal dos ratos do grupo controle; B) Cripta duodenal dos ratos alimentados com PLQ Resistente; C) Cripta duodenal dos ratos alimentados com PLQ Suscetível. CC – Células caliciformes; CR – Célula de reserva.

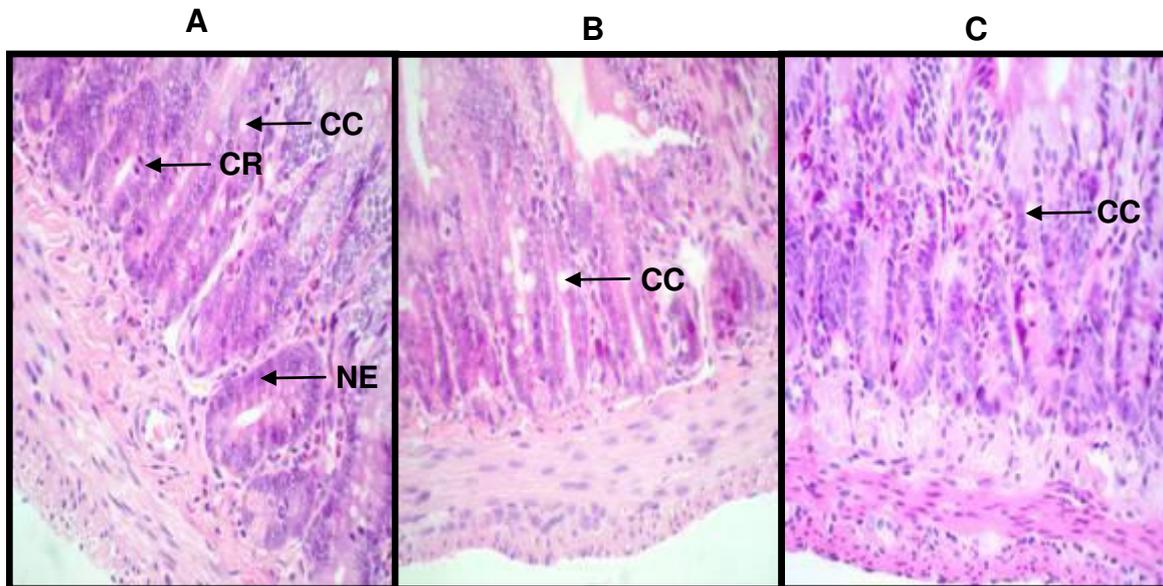


FIGURA 21. Cortes do jejuno de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle). A) Cripta do jejuno de ratos do grupo controle; B) Cripta do jejuno de ratos alimentados com PLQ Resistente; C) Cripta do jejuno de ratos alimentados com PLQ Suscetível. CC – Células caliciformes; CR – Célula de reserva.

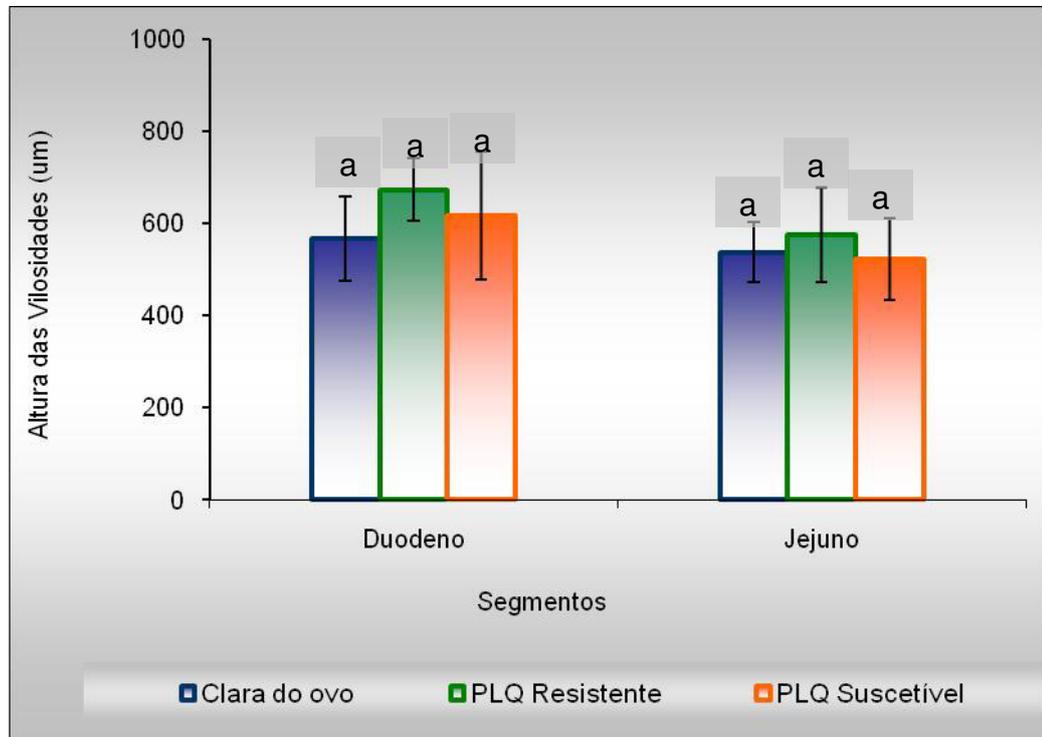


FIGURA 22. Medidas da altura das vilosidades efetuadas em cortes histológicos de duodeno e jejuno, de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle). Letras iguais indicam resultados estatisticamente não diferentes pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

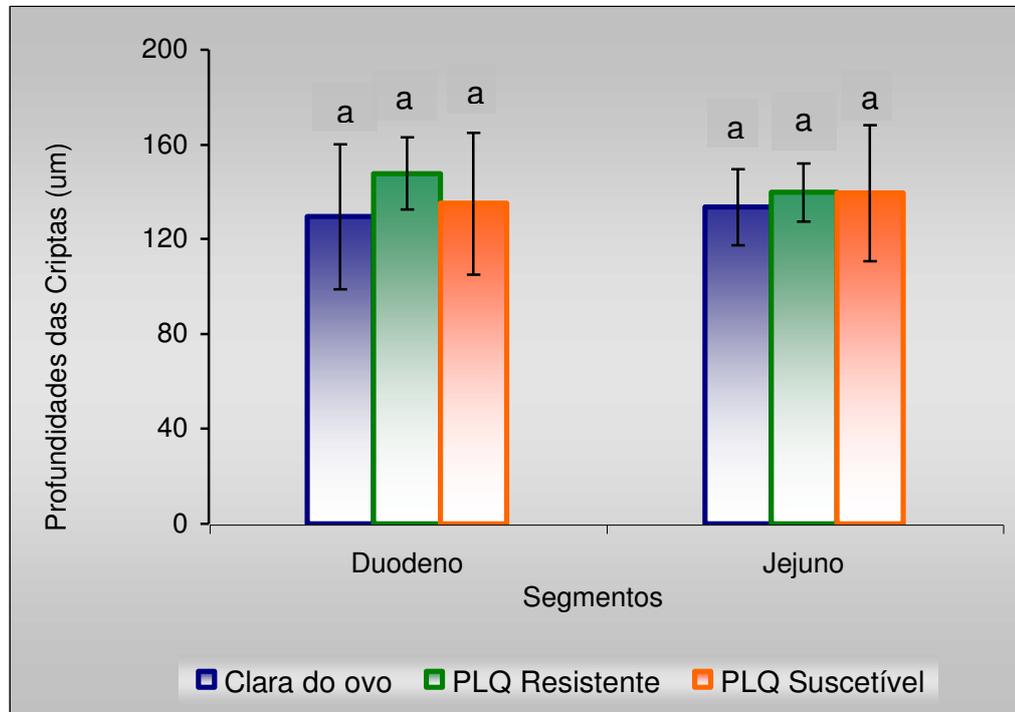


FIGURA 23. Medidas da profundidade das criptas efetuadas em cortes histológicos de duodeno e jejuno, de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle). Letras iguais indicam resultados estatisticamente não diferentes pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

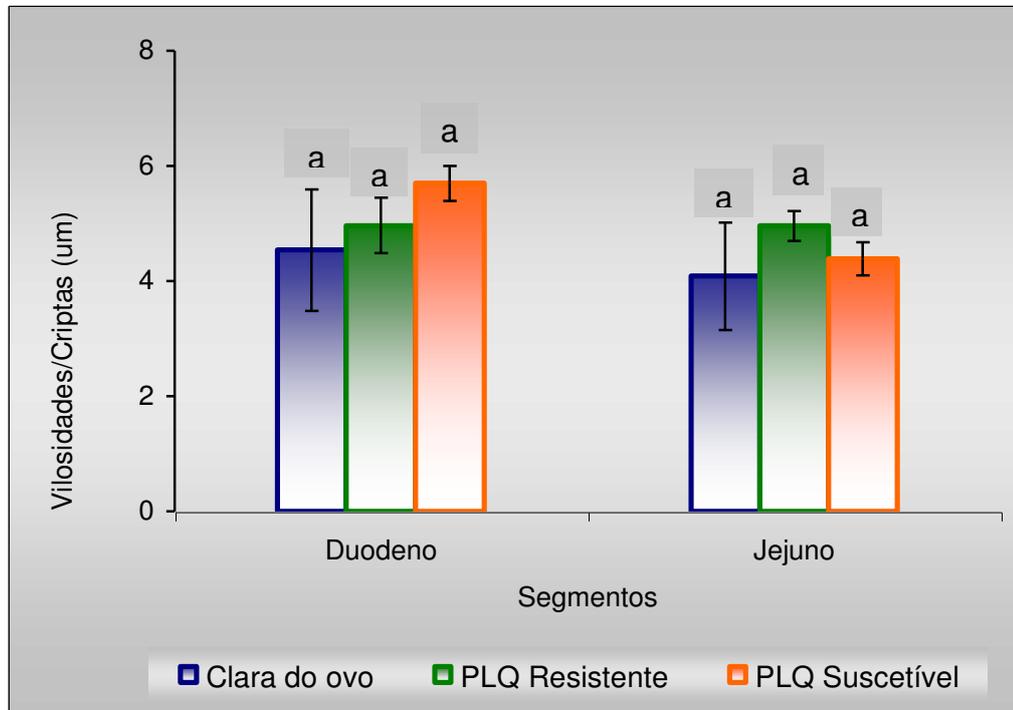


FIGURA 24. Medidas da relação vilosidade/cripta efetuadas em cortes histológicos de duodeno e jejuno, de ratos alimentados com dietas à base de proteínas ligantes à quitina (PLQ) de sementes de feijão caupi, genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, comparado com o tratamento contendo dieta preparada com albumina da clara de ovo (grupo controle). Letras iguais indicam resultados estatisticamente não diferentes pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

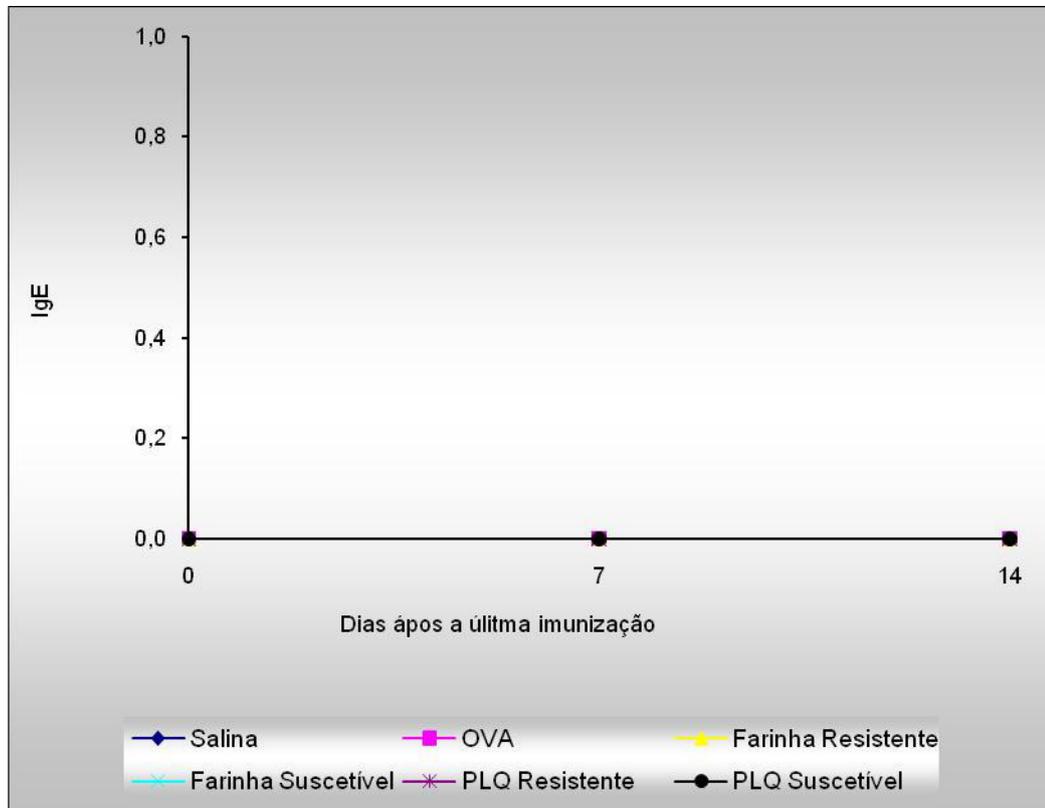


FIGURA 25. Cinética da síntese de IgE-específica. Camundongos foram imunizados por via oral com diferentes antígenos e a sorologia foi avaliada por anafilaxia cutânea passiva (PCA). A imunização foi feita durante dez dias consecutivos, usando 100 μ g de proteína. Antígenos: Ovalbumina (OVA); farinha do genótipo resistente (IT81D 1053); farinha do genótipo suscetível (BR9 Longá); fração ligante à quitina de IT81D 1053 (PLQ Resistente); fração ligante à quitina de BR9 Longá (PLQ Suscetível).

7. DISCUSSÃO

Uma avaliação da resistência ou suscetibilidade de vários genótipos de feijão caupi ao *Callosobruchus maculatus*, foi realizada através de análises relacionadas ao ciclo biológico desse inseto. Esses estudos foram conduzidos por Freire (2002) no Laboratório de Citogenética, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Segundo resultados obtidos nesse estudo, o genótipo IT81D 1053 foi considerado como um dos mais resistentes ao ataque do desse inseto, enquanto o genótipo BR9 Longá foi caracterizado como sendo o mais suscetível. Com base nesses dados, aliado ao fato de que o aumento da produtividade e qualidade requer um trabalho contínuo de criação e seleção de novos genótipos ou, ainda, a introdução de novos genes e considerando que são poucos os estudos relacionando resistência a pragas e valor nutricional dos genótipos desenvolvidos e/ou transformados, os genótipos BR9 Longá (suscetível) e IT81D 1053 (resistente) foram selecionados para serem objetos de estudo da presente investigação. Os genótipos foram comparados através de várias análises bioquímicas e nutricionais, com objetivo de avaliar se as modificações sofridas pelo genótipo IT81D 1053, que o tornou resistente ao *Callosobruchus maculatus*, trouxeram alterações à sua qualidade nutricional. Esse enfoque se justifica pela importância em se garantir o consumo seguro de fontes alimentícias provenientes de melhoramento genético, seja por métodos convencionais ou pelo uso da biotecnologia moderna, particularmente após a recente aprovação do plantio de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) em nosso país, através da Lei de Biossegurança/2005.

Os genótipos BR9 Longá e IT81D 1053, suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus*, respectivamente, serão, a partir desse ponto, chamados apenas de suscetível e resistente. No presente trabalho em uma primeira abordagem, os estudos foram conduzidos apenas com farinhas das sementes de ambos os genótipos citados.

Os resultados relativos à composição centesimal dos grãos (TABELA 3) reforçam que o feijão caupi se constitui em uma boa fonte de proteínas e de calorías (devido ao seu alto conteúdo de carboidratos). Os teores protéicos de 26,61 e 23,45 e g/100 g de matéria seca, para os genótipos suscetível e

resistente, respectivamente, diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Apesar da diferença, esses conteúdos se assemelham aos encontrados em outros genótipos de feijão caupi: 19,50 a 26,10 g/100 g de matéria seca (MAIA *et al.*, 2000); 23,03 a 23,41 g/100 g de matéria seca (PAULA, 2003); 21,60 a 24,7 g/100 g de matéria seca (CASTELLON *et al.*, 2003); 25,94 g/100 g de matéria seca (AKINJAYEJU e BISIRIYU, 2004); 20,10 a 25,80 g/100 g de matéria seca (GIAMI *et al.*, 2001); 24,70 g/100 g de matéria seca (IQBAL *et al.*, 2006); 26,10 g/100 g de matéria seca (RIVAS-VEJA *et al.*, 2006); 24,70 g/100 g de matéria seca (OLIVEIRA-CASTILLO *et al.*, 2007); 23,58 e 26,59 g/100 g de matéria seca (KAPTSO *et al.*, 2008). Diferenças significativas entre os dois genótipos estudados foram, ainda, encontradas nos teores de fibra bruta (4,32 e 5,20 g/100 g de matéria seca). Todavia, os valores para os dois genótipos estão dentro das faixas detectadas por Maia (2003) e Onwuliri *et al.* (2002), 3,77 a 6,23 e 1,7 a 4,50 g/100 g de matéria seca, respectivamente. Uma vez que os conteúdos de proteína e fibra estão dentro da faixa esperada, esse fato demonstra que o melhoramento genético não introduziu grandes mudanças no que diz respeito à análise dos componentes citados.

Em relação aos outros constituintes, foram detectados altos teores de carboidratos (61,62 e 62,94 g/100 g de matéria seca) e de cinzas (4,15 e 4,52 g/100 g de matéria seca), ao lado de baixos conteúdos de lipídios (3,30 e 3,89 g/100 g de matéria seca). Para os três constituintes citados, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os genótipos suscetível e resistente analisados. Os valores de carboidratos diferem de alguns outros descritos na literatura: 44,10 a 44,30 g/100 g de matéria seca (ADEBOOYE e SINGH, 2008); 55,83 a 57,67 g/100 g de matéria seca (KAPTSO *et al.*, 2008); 66,62 a 68,44 g/100 g de matéria seca (PAULA, 2003); 67,78 a 76,08 g/100 g de matéria seca (MAIA *et al.*, 2000); 71,40 a 74,50 g/100 g de matéria seca (CASTELLON *et al.*, 2003) e 74,80 g/100 g de matéria seca (RIVAS-VEGAS *et al.*, 2006). Os teores de cinza são próximos, ou ligeiramente superiores, aos verificados por Onwuliri *et al.* (2002), Castellón *et al.* (2003) e Iqbal *et al.* (2006), cujos valores correspondem a 2,8 a 3,3, 2,3 a 3,2 e 4,8 g/100 g de matéria seca. Em relação aos teores de lipídios, esses foram superiores, em

alguns casos, aos de outros genótipos de feijão caupi, cujos valores variaram de 1,05 a 3,03 g/100 g de matéria seca (ONWULIRI *et al.*, 2002; CASTELLÓN *et al.*, 2003; RUBASINGHEGE *et al.*, 2006; RIVAS-VEJA *et al.*, 2006). Já Iqbal e colaboradores (2006) encontraram um valor de lipídio bem superior, correspondendo a 4,8 g/100 g de matéria seca. Embora se tenha conhecimento de que a manipulação genética no melhoramento de novos genótipos possa acarretar uma grande variação na composição química de um modo geral (GIAMI *et al.*, 2001), o melhoramento genético introduzido no genótipo IT81D 1053, conferindo resistência ao *C. maculatus*, não acarretou grandes modificações em suas composições químicas.

Um outro parâmetro comparado foram os perfis eletroforéticos das farinhas das sementes dos genótipos suscetível e resistente, obtidos por PAGE na presença de SDS e β -mercaptoetanol (FIGURA 6). Em geral, os perfis mostraram-se muito semelhantes entre si, exceto a existência de uma banda mais proeminente na região de 29 kDa verificada no genótipo resistente. Bandas mais intensas foram observadas em ambos os genótipos na faixa 45 a 66 kDa, massas moleculares estas que compreendem proteínas presentes na fração globulinas (MENDOZA *et al.*, 2001; MAIA, 2003; PAULA, 2003).

Muito embora tenha sido constatado que as sementes dos genótipos suscetível e resistente estudadas constituem-se boas fontes de calorias e proteínas, fatores antinutricionais, tais como lectina, inibidor de tripsina e urease, foram detectados em todas elas. Atividade hemaglutinante não foi observada nos extratos brutos dos genótipos suscetível e resistente quando usadas hemácias normais, ou seja, não tratadas enzimaticamente. O tratamento das hemácias com tripsina, por sua vez, capacitou à aglutinação (TABELA 4). Certamente, o tratamento enzimático expôs os carboidratos presentes na superfície da membrana, favorecendo a aglutinação. Indiferentemente da resistência ao *Callosobruchus maculatus*, o mesmo conteúdo de lectina (0,10 UH/mgF) foi encontrado para ambos os genótipos, teor esse relativamente baixo quando comparado aos presentes em sementes de soja (*Glycine max*) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (GRANT *et al.*, 1995). Conteúdos similares aos encontrados para os genótipos suscetível e

resistente foram detectados por Maia (2003), quando analisou outros seis diferentes genótipos de feijão caupi e usou hemácias tripsinizadas. Quanto ao inibidor de tripsina, o genótipo resistente apresentou uma maior atividade (18,55 mg de tripsina inibida/gF) em comparação ao suscetível (12,57 mg de tripsina inibida/gF). Entretanto, estudos realizados com vários acessos de feijão caupi têm mostrado não haver uma relação direta entre o conteúdo de inibidor de tripsina e a resistência ao gorgulho (XAVIER-FILHO e COELHO, 1980; XAVIER-FILHO *et al.*, 1989; MARCONI *et al.*, 1993). Os teores de inibidor de tripsina detectados na farinha dos dois genótipos estudados estão dentro da faixa encontrada por Ene-Obong (1995), 9,8 a 20,5 mg de tripsina inibida/gF, e menores ou mesmo semelhantes aos detectados por Maia *et al.* (2000), 12 a 30,56 mg de tripsina inibida/gF. Em relação à outra proteína analisada, a urease, da mesma forma que a lectina e o inibidor de tripsina, esta não pode ser relacionada com a resistência ao *Callosobruchus maculatus*, já que as farinhas de ambos os genótipos, suscetível e resistente, apresentaram atividades equivalentes, correspondentes a 25,13 e 25,41 U/gF, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre elas. Essas atividades se mostraram superiores às detectadas em outros genótipos de feijão caupi, 9,70 a 20,49 (PAULA, 2003; MAIA, 2003), e bem inferiores àquelas verificadas na soja, 107,32 a 219,28 U/gF (VASCONCELOS *et al.*, 1997; 2001; 2006). Os constituintes analisados, juntamente com a deficiência de aminoácidos sulfurados, têm comprometido o valor nutricional de várias leguminosas, podendo diminuir a disponibilidade dos nutrientes e/ou causar efeitos fisiológicos adversos (SILVA e SILVA *et al.*, 2000; MUBARAK, 2005).

Apesar dos dados discutidos até o momento não terem evidenciadas propriedades que pudessem trazer comprometimento à qualidade nutricional das sementes resistentes ao *Callosobruchus maculatus*, quando comparadas ao genótipo suscetível, se tem conhecimento que a forma mais confiável de avaliar o valor nutritivo de uma determinada fonte é através de sua inclusão na dieta. Assim, ensaios biológicos, usando ratos em crescimento, foram realizados, tendo sido adicionadas em suas dietas farinhas dos genótipos suscetível e resistente como única fonte de proteínas.

Os animais alimentados com as dietas contendo farinhas dos genótipos suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus* apresentaram menores taxas de crescimento que os animais mantidos com dieta à base de albumina da clara do ovo (controle) (FIGURA 7). A suplementação das dietas à base de farinhas das sementes com metionina suscitou em melhor desempenho dos animais. Mesmo assim as curvas de crescimento ficaram abaixo daquela apresentada pelo controle positivo. O desempenho inferior dos animais submetidos às dietas contendo farinha dos genótipos, suplementada ou não, em relação à dieta contendo albumina da clara do ovo, pode ser visualizado melhor através dos dados de percentual de ganho de peso (TABELA 5). Ao se relacionar farinha do genótipo suscetível com resistente, o tratamento correspondente à dieta contendo farinha do genótipo resistente foi o que mais se aproximou do controle positivo, especialmente quando considerada a suplementação com metionina. Esse fato está, possivelmente, relacionado ao maior consumo de dieta e, conseqüentemente, melhor utilização dos nutrientes (FIGURA 8). Nos estudos realizados por Maia (2003) e Oliveira *et al.* (2003), animais alimentados com farinhas de sementes de feijão caupi apresentaram taxas de crescimento inferiores àqueles mantidos com dietas à base de albumina da clara do ovo, mesmo quando as farinhas dos genótipos foram suplementadas com metionina.

As relações entre eliminação fecal e consumo de dieta ($F/D \times 100$) e entre nitrogênio fecal e nitrogênio ingerido ($FN/N \times 100$) mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação ao controle (TABELA 6). Isso, provavelmente, tem ligação com a menor digestibilidade das proteínas e/ou presença de fatores antinutricionais. Quando comparados os dois genótipos de feijão caupi em estudo, as razões F/D e FN/N praticamente não diferiram entre os tratamentos, exceto no grupo mantido com a dieta contendo farinha do genótipo resistente suplementada com metionina. Nesse último caso, valores ligeiramente menores, porém significativos ($p < 0,05$), foram observados, demonstrando uma maior retenção de nitrogênio.

Outros parâmetros nutricionais foram avaliados no presente trabalho (TABELA 7). Para confirmar a biodisponibilidade dos aminoácidos constituintes

das proteínas foi avaliada a digestibilidade verdadeira *in vivo* que, por sua vez, poderia ter sido prejudicada pela presença de fatores antinutricionais e/ou estrutura compacta das proteínas (CARBONARO *et al.*, 2000). As farinhas dos genótipos apresentaram valores de digestibilidade baixos (67,40 a 70,23%), em relação ao grupo controle (98,04%). Quando a qualidade das proteínas das farinhas dos dois genótipos foi avaliada pelo parâmetro NPU (utilização líquida de proteína), os valores detectados (39,70% e 39,78%) foram aquém daquele encontrado para o grupo submetido à dieta contendo albumina da clara do ovo (87,36%). Em relação ao valor biológico, o mesmo quadro foi detectado, isto é, uma qualidade nutricional inferior das dietas compreendendo as farinhas dos genótipos de caupi em relação à albumina da clara do ovo (83,91%). Quando comparados os genótipos suscetível e resistente entre si, diferenças significativas ($p > 0,05$) não foram encontradas nos cálculos de digestibilidade, NPU e valor biológico. A inclusão de metionina causou aumento nos três parâmetros analisados, porém não foi suficiente para tornar a diferença significativa ($p > 0,05$). Os valores encontrados são próximos aos obtidos em outros trabalhos, em experimentos semelhantes utilizando farinha de sementes de genótipos de feijão caupi como fonte de proteínas. Grant e colaboradores (1995) e Friedman (1996), por exemplo, encontraram percentuais de NPU equivalentes a 38,0 e 45,0, respectivamente. Por outro lado, ainda que valores detectados para o feijão caupi sejam inferiores aos da albumina da clara do ovo, os dados evidenciam sua qualidade nutricional, justificando a importância nutricional, particularmente quando comparado a outras leguminosas. *Canavalia maritima* é um dos exemplos (SEENA *et al.*, 2005). Um outro exemplo é a *Cratylia floribunda* que apresentou, inclusive, valores negativos para alguns dos parâmetros citados (RIOS, 1998).

O consumo das dietas experimentais induziu alterações no peso de órgãos internos dos animais. Os animais que receberam a dieta aprotéica apresentaram maior peso relativo de alguns órgãos, como pulmões e coração, provavelmente, em uma tentativa de preservação desses órgãos (TABELA 9). O consumo das dietas contendo os genótipos de feijão caupi resultou em hipertrofia do pâncreas e intestino grosso (TABELA 8). Essas alterações,

entretanto, não estão relacionadas aos fatores ligados à resistência dos genótipos, já que suscetível e resistente apresentaram resultados similares. A hipertrofia do pâncreas, em particular, deve estar ligada à presença de inibidor de tripsina, como tem mostrado vários experimentos com foco na avaliação do valor nutricional de leguminosas (GRANT, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003). No caso da soja, é sabido que a aglutinina (SBA) causa, também, hipertrofia do pâncreas e intestino delgado de ratos, e que o inibidor de tripsina é o principal responsável pela hipertrofia do pâncreas (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Se o inibidor de tripsina é, de fato, o responsável pela hipertrofia pancreática, os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que mesmo o genótipo suscetível possuindo menor teor dessa proteína em relação ao resistente, esse já foi suficiente de causar alterações no peso do pâncreas. Além do mais, apesar da diferença no teor de inibidor de tripsina nos dois genótipos, esta não resultou em alterações significativas quando comparados os pesos do pâncreas de animais pertencentes aos tratamentos contendo genótipo suscetível e resistente.

Os dados obtidos com farinhas dos genótipos suscetível e resistente ao *Callosobruchus maculatus* mostram que, embora o feijão caupi não tenha valor nutricional similar ao da albumina da clara do ovo, uma proteína animal de referência, essa leguminosa apresenta boa qualidade nutritiva, o que justifica sua inclusão na dieta. Além disso, em consonância com os objetivos do presente trabalho, os dados indicam que o melhoramento genético, o qual conferiu resistência ao *Callosobruchus maculatus*, não foi capaz de alterar a qualidade nutricional dessa leguminosa. Ao contrário, para alguns parâmetros parece ter havido uma melhora, como exemplo o percentual de ganho de peso que foi mais elevado nos tratamentos contendo o genótipo resistente. Esses resultados, do ponto de vista econômico e nutricional, podem ser considerados excelentes, assegurando que o melhoramento genético além de tornar as sementes mais resistentes ao gorgulho, proporcionando maior disponibilidade de sementes de caupi, manteve a elevada qualidade nutricional dessa leguminosa.

Visando dar maior sustentabilidade à afirmativa recentemente citada, isto é, de que o melhoramento genético introduzido além ter conferido maior resistência ao *Callosobruchus maculatus* não diminuiu a qualidade nutricional do caupi, em uma segunda abordagem, no presente trabalho, as proteínas ligantes à quitina (PLQ) passaram a ser objetos de estudo. A razão para utilização das PLQ foi decorrente do fato delas compreenderem, também, as vicilinas e vicilinas variantes, estas últimas relacionadas à resistência apresentada por alguns genótipos de caupi ao *Callosobruchus maculatus* (MACEDO *et al.*, 1993; SALES *et al.*, 1996).

As PLQ foram purificadas de extrato total, obtido a partir da farinha de sementes dos genótipos suscetível e resistente, através de cromatografia em coluna de quitina, e foram denominadas de PLQ suscetível e PLQ resistente, respectivamente (FIGURAS 9 e 10). No procedimento de purificação, foi verificada uma maior interação de proteínas oriundas do genótipo resistente com a quitina em comparação ao suscetível. Das 250 mgP aplicadas na coluna de quitina, ficaram retidas 0,98 mgP e 0,87 mgP, correspondentes as PLQ resistente e suscetível, respectivamente. Uma das características das vicilinas é sua capacidade de interagir com quitina, um homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina. Entretanto, vicilinas presentes no genótipo resistente, chamadas de vicilinas variantes, possuem maior afinidade pela quitina do que àquelas do genótipo suscetível (SALES *et al.*, 1996; 2001). Além disso, nos genótipos de feijão caupi que são resistentes ao gorgulho é verificada uma associação mais forte das vicilinas variantes a membranas quitinosas do tubo digestivo do próprio inseto *Callosobruchus maculatus* (FIRMINO *et al.*, 1996). As PLQ possuem massas moleculares relativamente elevadas, predominando bandas protéicas com massa molecular aparente na região de 60 kDa (FIGURA 11).

Nos genótipos avaliados, as PLQ representam em torno de 1% da proteína total das sementes. Assim, na avaliação de suas propriedades antinutricionais e/ou tóxicas, dietas foram formuladas contendo PLQ suscetível e PLQ resistente na mesma proporção em que estão presentes nas sementes dos respectivos genótipos. De modo a atingir o percentual protéico mínimo

(10%) requerido nas dietas, uma complementação foi feita com albumina da clara do ovo (TABELA 2), a proteína considerada como referência.

Os animais pertencentes aos tratamentos contendo as PLQ apresentaram desempenho similar, ou mesmo superior ao do grupo controle, cuja fonte protéica foi constituída apenas por albumina da clara do ovo (FIGURA 16). Uma das razões para o bom desempenho, comparado ao verificado com a farinha de sementes dos genótipos suscetível e resistente, pode estar relacionada à boa aceitação da dieta (FIGURA 17). A não interferência das PLQ nesses parâmetros (crescimento e consumo de dieta) pode ser visualizada de forma mais nítida na análise do percentual de ganho de peso (TABELA 10). Ao se relacionar o percentual de ganho de peso dos tratamentos contendo PLQ suscetível (69,11%) e PLQ resistente (75,40%), não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$). O tratamento contendo PLQ resistente mostrou, inclusive, valor superior ao do tratamento controle (64,65%). Em relação ao tratamento contendo PLQ suscetível, diferença significativa em relação ao controle não foi observada ($p > 0,05$), muito embora tenha sido verificada uma tendência para maior ganho de peso no grupo que continha as PLQ incluídas em sua dieta.

As relações entre eliminação fecal e consumo de dieta ($F/D \times 100$) e entre nitrogênio fecal e nitrogênio ingerido ($FN/N \times 100$) mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação ao controle (TABELA 11). Na comparação dos tratamentos contendo PLQ suscetível com PLQ resistente, diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$). A relação $F/D \times 100$ foi superior nos tratamentos contendo as PLQ em comparação ao controle. Diferentemente, a relação $FN/N \times 100$ foi inferior nos tratamentos experimentais (PLQ suscetível e PLQ resistente). Isso demonstra que o consumo de dietas contendo PLQ resultou em maior retenção de nitrogênio, justificando o excelente desempenho dos animais.

Corroborando com os dados obtidos, mostrando a inexistência de propriedades antinutricionais e/ou tóxicas associadas às PLQ, estão os dados de digestibilidade, NPU e valor biológico (TABELA 12). Os animais submetidos às dietas contendo PLQ suscetível e PLQ resistente apresentaram valores dos

parâmetros citados similares aos do controle. Os valores elevados de digestibilidade (superior a 98%) e NPU (superior a 84%) justificam o alto valor biológico das dietas utilizadas, propiciando crescimento dos animais altamente satisfatório. Resultados semelhantes aos descritos para as PLQ foram verificados após inclusão de globulinas de feijão caupi em dietas, genótipos Canapuzinho e TE93 244 23, complementadas com albumina de ovo (MAIA, 2003).

Assim como no primeiro ensaio biológico, vários órgãos internos dos animais foram analisados (TABELAS 13 e 14). As PLQ, sejam do genótipo suscetível, sejam do genótipo resistente, não influenciaram no peso dos órgãos analisados, visto que não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao tratamento contendo a proteína padrão. Em uma análise mais minuciosa de órgãos, e considerando que no intestino delgado é onde ocorre a maior absorção de nutrientes e, ainda que, se trata de um alvo para muitas proteínas com propriedades deletérias, segmentos do duodeno e jejuno foram analisados (FIGURAS 18-24). As vilosidades na região do duodeno e jejuno dos animais expostos às dietas contendo PLQ foram mantidas intactas, semelhantemente ao verificado no tratamento controle. As criptas não sofreram, também, alterações. Esses dados confirmam a ausência de propriedades antinutricionais e/ou tóxicas ligadas às PLQ. Maia (2003) não encontrou alterações histológicas no intestino de ratos após inclusão de globulinas de caupi em sua dieta. Similarmente, o intestino delgado e pâncreas de ratos alimentados com proteínas isoladas de feijão caupi apresentaram aspectos histológicos normais, quando comparados com ratos mentidos em dieta à base de caseína (RANGEL *et al.*, 2004).

A resistência apresentada por alguns genótipos de feijão caupi ao *Callosobruchus maculatus* envolve uma associação mais forte das vicilinas variantes a membranas quitinosas do tubo digestivo (FIRMINO *et al.*, 1996). Assim, se a interação com a quitina for um pré-requisito para ocorrência de efeitos, o fato das PLQ não terem trazido implicações deletérias aos animais experimentais já seria, de certa forma, presumível, visto que a quitina é um polissacarídeo estrutural não presente em mamíferos monogástricos. Todavia,

tem sido discutido que na interação com a matriz de quitina, usada para obtenção das PLQ, há outras ligações além daquelas por afinidade. Tanto isso ocorre que, algumas vezes, mesmo tendo sido usadas altas concentrações de *N*-acetil-D-glucosamina, não houve remoção completa das proteínas retidas, necessitando de pHs extremos (GIFONI, 2004). Com base nisso e, também, considerando que para ser feita uma afirmação segura dos efeitos antinutricionais e/ou tóxicos de uma proteína é requerida a sua administração de forma pura, as PLQ, livres de outros componentes das sementes, foram avaliadas.

Ainda que as respostas apresentadas pelos animais que consumiram as PLQ tivessem sido previstas, foi questionado se a ausência de efeitos não estaria relacionada à quantidade de PLQ utilizada, apenas 1% da proteína total da dieta. Assim, ao invés de realizar um novo experimento, incluindo nas dietas teores mais elevados de PLQ, pois isso demandaria um maior tempo e a utilização de mais animais, optou-se por fazer uma avaliação do comportamento dessas proteínas frente às principais enzimas envolvidas na digestão proteolítica em mamíferos monogástricos. Essa avaliação teve como base as informações de que a ocorrência de efeitos decorrentes de uma dada proteína requer a sua resistência, pelo menos, parcial à proteólise (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Assim, a digestão total das PLQ, caso houvesse, poderia explicar a ausência de efeitos deletérios relacionados ao seu consumo.

Primeiramente, as PLQ foram incubadas separadamente com as enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina nos tempos 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas. PLQ suscetível e PLQ resistente quando incubadas com pepsina até 6 horas mostraram-se bastante resistente à digestão proteolítica, diferentemente do que ocorreu com a BSA, que foi totalmente digerida nos primeiros 30 minutos de incubação (FIGURAS 12 e 13). Resistência das globulinas de sementes secas e maduras de feijão caupi à pepsina, após 4 horas de incubação foi, também, verificada por (ARAÚJO *et al.*, 2002). Há, inclusive, registros mostrando que vicilinas de sementes de feijão caupi, resistente e suscetível ao *Callosobruchus maculatus*, não foram digeridas pela pepsina, continuando

intactas (SALES *et al.*, 1992). Por outro lado, a incubação das PLQ com tripsina ou quimiotripsina resultou em proteólise. No entanto, a digestão parece ter sido maior com tripsina. PLQ resistente se mostraram menos sensível à ação enzimática dessas enzimas do que PLQ suscetível (FIGURAS 12 e 13). Digestão de globulinas de feijão caupi pela tripsina e quimiotripsina foi anteriormente relatada. Tripsina foi capaz de clivar globulinas de sementes maduras e imaturas de feijão caupi, gerando produtos de 30 a 18 kDa, logo após 5 minutos de digestão. Já a quimiotripsina, mesmo após 4 horas de incubação, causou digestão mais branda das globulinas (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Uma simulação do processo de digestão seqüencial que ocorre nos animais monogástricos foi realizada, com a finalidade de se ter uma idéia do comportamento das PLQ no trato digestório desses animais. PLQ suscetível e PLQ resistente foram completamente digeridas (FIGURAS 14 e 15), sendo a hidrólise visualizada mais precocemente nas PLQ Suscetível. Esses dados apontam a alta suscetibilidade das PLQ à proteólise, particularmente pelas enzimas que atuam em pH alcalino, justificando os resultados obtidos na avaliação dos efeitos antinutricionais e/ou tóxicos das PLQ, relatados anteriormente.

Os dados em conjunto obtidos no presente trabalho mostram que, embora o feijão caupi não tenha qualidade nutricional similar à albumina da clara do ovo, certamente não é devida à ação das PLQ, que compreendem as vicilinas, visto que não foram observados efeitos deletérios nos animais experimentais que pudessem ser associados ao consumo dessas proteínas. Além disso, embora PLQ resistente, aparentemente, tenham se mostrado mais resistente à proteólise, do que PLQ suscetível, essas proteínas foram utilizadas de forma bem similar pelos animais. Com base em alguns parâmetros, o aproveitamento das PLQ resistente foi, até mesmo, superior, reforçando que o melhoramento genético não comprometeu a qualidade nutricional do feijão caupi.

Complementando a comparação dos possíveis efeitos deletérios oriundos do consumo dos genótipos estudados, os estudos com foco na alergenicidade mostraram que, por via oral, pode ter havido uma tolerância

adquirida pelo animal às proteínas presentes nas farinhas de ambos genótipos, bem como às PLQ suscetível e PLQ resistente, já que não houve produção de IgE. Todavia, para que possa ser afirmado que as fontes protéicas em análise (farinha e PLQ) não são alergênicas, testes adicionais precisam ser realizados, avaliando seus efeitos por outras vias de imunização. Lectina da *Lablab purpureus*, por exemplo, quando administrada aos camundongos pela via subcutânea gera uma resposta imune mais potente do que pela via oral (PERREIRA 2000). Frações do látex de *Calotropis procera* também elicitaram a síntese de IgE quando imunizadas em camundongos pela via subcutânea, mas não pela via oral. Isso evidencia a indução da tolerância adquirida pelos camundongos pelas proteínas do látex (RAMOS, 2007). Além da tolerância que pode ser adquirida pelos organismos imunizados pela via oral, sabe-se que a resposta imune por essa via é muito difícil, e requer doses elevadas e repetidas de antígenos. Isso é devido, também, à presença de enzimas proteolíticas no trato digestório dos animais, além do pH ácido estomacal. Além do mais, a resposta imunológica quando induzida pela via oral é baixa, de curta duração e, freqüentemente, confinada às mucosas (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1991; MELO *et al.*, 1994; MAUREEEN *et al.*, 1986; PEREIRA, 2000).

8. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho mostram que o melhoramento genético do feijão-de-corda que, por sua vez, conferiu resistência ao inseto *Callosobruchus maculatus* não alterou sua qualidade nutricional, desde que sementes de genótipos dessa leguminosa, suscetível (BR9 Longá) e resistente (IT81D 1053) ao gorgulho, quando incluídas na dieta como única fonte de proteínas, foram igualmente aproveitadas pelos animais. Além disso, foi observado que, embora o caupi não tenha qualidade nutricional similar à albumina da clara do ovo, uma proteína de alto valor biológico, certamente isso não é devido à ação das proteínas ligantes á quitina, compreendendo vicilinas normais e variantes, visto que não foram observados efeitos antinutricionais, tóxicos e/ou alergênicos nos animais experimentais que pudessem ser associados ao consumo dessas proteínas. Do ponto de vista econômico e nutricional, esses resultados são de grande valia, assegurando que o melhoramento genético introduzido, além de ter tornado as sementes mais resistentes a essa praga de grande importância agrícola, manteve a elevada qualidade nutricional dessa leguminosa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acesse Piauí. **Feijão do Piauí é referência nacional**. Disponível em: <http://www.acessepiaui.com.br/geral2.php?id=52012&ref=200605>.
2. ADEBOOYE, O. C.. SING, V. Physico-chemical properties of the flours and starches of two cowpea varieties (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 92-100, 2008.
3. AKINJAYEJU, O.. BISIRIYU, K. Comparative studies of some properties of dehulled, mechanically dehulled and manually dehulled cowpea (*Vigna unguiculata* Walp. L.) flours. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 355-360, 2004.
4. ANDERSON, L., DIBBLE, M. V., TURKKI, P. R., MITCHELL, H. S., RYNBERGEN, H. J. Proteínas. In: **Nutrição**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. cap. 4, p. 43-52.
5. AOAC, **Association of Analytical Chemistry**. Official Methods of Analysis. Washington, D. C. ,1213p, 1980.
6. ARAÚJO, A. H., CARDOSO, P. C. B., PEREIRA, R. .A, LIMA, L. M., OLIVEIRA, A. S., MIRANDA, M. R. A., XAVIER-FILHO, J., SALES, M. P. In vitro digestibility of globulins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and xerophitic algaroba (*Prosopis juliflora*) seeds by mammalian digestive proteinases: a comparative study. **Food Chemistry**, v. 78, p. 143-147, 2002.
7. ATHERTON, K. T. Safety assessment of genetically modified crops. **Toxicology**, v. 181 – 182, p. 421 – 426, 2002.

8. BAETHGEN. W. E., ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Soil Science**, v, 20, p, 961-969, 1989.
9. BARRETO, P. D., QUINDERÉ, M. A. W. Resistência de genótipos de caupi ao caruncho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 35, n. 4, p. 779-785, 2000.
10. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
11. CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: antinutritinal compounds or storage proteins? **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 742-749, 2000.
12. CARDOSO, M. J., **A cultura do caupi no meio norte do Brasil**. Teresina: Empresa Brasileira de pesquisas Agropecuária - EMBRAPA, p. 264, 2000.
13. CASEY, R., DOMONEY, C., ELLIS, N. Legume storage proteins and their genes. In: MIFLIN, B. J. (ed.). Oxford **Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1986. v. 3, p. 1-95.
14. CASTELLÓN, R. E. R., ARAÚJO, F. M. M. C., RAMOS, M. V., NETO, M. A., FILHO, F. R. FREIRE, GRANGEIRO, T. B., CAVADA, B. S. Composição elementar e caracterização da fração lipídica de seis cultivares de caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 1, pp. 149-153, 2003.

15. COATES, M. E., O'DONOGHUE, P. N., PAIYNE, P. R., WARD, R. J. Dietary standards for laboratory rats and mice – nutritional and microbiological recommendation. **Laboratory animal handbook 2**. London: Laboratories Animals, Ltda. p. 13-15, 1969.
16. COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. **Os princípios éticos da experimentação animal**. São Paulo, 1991. Disponível em: < <http://www.cobea.org.br>>.
17. COSTA, N. P., JÚNIOR, A. L. B. Efeito de genótipos de caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp., sobre desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 077-083, 2004.
18. DERBYSHIRE, E., WRIGHT, D. J., BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, p. 3-24, 1976.
19. DUTRA, A. S., TEÓFILO, E. M. Envelhecimento acelerado para avaliar de sementes de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 193-197, 2007.
20. DYER, J. M., NELSON, J. W., MURAI, M. Strategies for selecting mutation sites for methionine enhancement in the bean seed storage protein phaseolin. **Journal of Protein Chemistry**, v. 12, p. 545-560, 1993.
21. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. 2007. Disponível em: [http:// http://www.embrapa.br/](http://www.embrapa.br/).

22. ENE-OBONG, H. N. Contento f antinutrients and in vivo protein digestibility of the African yambean, pigeon and cowpea. **Plant Food for Human Nutrition**, v. 48, p. 225-233, 1995.
23. FERNANDES, K. V. S., SABELLI, P. A., BARRATT, D. H. P., RICHARDSON, M., XAVIER-FILHO, J., SHEWRY, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 215-219, 1993.
24. FERREIRA, R. B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C. N., CHEN, Z., BATISTA, L. M., DUARTE, J., BORGES, A., TEXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pethogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 677-700, 2007.
25. FIRMINO, F., FERNANDES, K. V. S., SALES, M. P., GOMES, V. M., MIRANDA, M. R. A., DOMINGUES, S. J. S., XAVIER-FILHO, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 749-756, 1996.
26. FREIRE FILHO, F. R., RIBEIRO, V. Q., SANTOS, A. A. In: Cardoso, M. J. (Org.). **A cultura do feijão feijão-de-corda no Meio-Norte do Brasil**. cap. III. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000, p. 66-88.

27. FREIRE, E. A. **Genótipos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] melhorados geneticamente: caracterização em relação ao ataque pelo *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1972).** 2002, 70p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
28. FREIRE, R., RIBEIRO, V. Q., BARRETO, P. D., SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na região do Nordeste. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro.** (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov. 1999. Disponível via Word Wide Web <http://www.cpatsa.embrapa.br>. ISBN 85-7405-001-6.
29. FREITAS, R. L., TEIXEIRA, A. R., FERREIRA, R. B. Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 52, p. 1682-1687, 2004.
30. FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.6-29, 1996.
31. FUSCALDI, K; C., PRADO, G. R. Análise econômica da cultura do feijão. **Revista de Política Agrícola**, n. 1, p. 17-30, 2005.
32. GATEHOUSE, A. M. R., GATEHOUSE, J. A., DOBIE, P., KILMINSTER, A. M., BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 30, p.948 – 958, 1979.

33. GIAMI, S. Y., AKUSU, M. O., EMELIKE, J. N. Evaluation of selected food attributes of four advanced lines of ungerminated and germinated Nigerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Plant food for Human Nutrition**, v. 56, p. 61-73, 2001.

34. GIFONI, J. M. **Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu papel na defesa da planta**. 2004, 103p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

35. GOMES, C. E. M. **Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida***. 2004, 74p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

36. GOMES, V. M., MOSQUEDA, M. I., BLANCO-LABRA, A., SALES, M. P., FERNANDES, K. V., CORDEIRO, R. A., XAVIER-FILHO, J. Vicilin storage proteins *Vigna unguiculata* (legumes) seeds inhibit fungal growth. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 45, p. 4110-4115, 1997.

37. GRANITO, M., TORRES, A., FRIAS, J., GUERRA, M., VIDAL-VALVERDE, C. Influence of fermentation on the nutritional value of two varieties of *Vigna sinensis*. **European Food Research Technology**, v. 220, p. 176-181, 2005.

38. GRANT, G., DORWARD, P. M., PUSZTAI, A. Pancreatic enlargement is evident in rats fed containing raw soybeans (*Glycine max*) or cowpeas (*Vigna unguiculata*) for 800 days but not in those fed diets based on kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) or lupinseed (*Lupinus angustifolius*). **Journal of Nutrition**, v. 123, p.2207-2215, 1993.
39. GRANT, G., EDWARDS, J. E., EWAN, E. C., MURRAY, S., ATKINSON, T., FARNINGHAM, D. A. H., PUSZTAI, A. Secretion of pancreatic digestive enzymes induced in rats by first-time oral exposure to kidney bean E₂L₂ lectin is mediated only in part by cholecystokinin (CCK). **Pancreas**, v. 19, p. 382-389, 1999.
40. GRANT, G., MORE, L. J., MCKENZIE, N. O.H., DOWARD, P. M., BUCHAN, W. C., TELEK, L., PUSZTAI, A. Nutritional and hemagglutination properties of several tropical seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 124, p. 437-445, 1995.
41. HAMERSTRAND, G. H., BLACK, L. T., GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of standart analytical procedure. **Cereal Chemistry**, v. 58, p. 42-45, 1981.
42. HOSSAIN, M. A., BECKER, K. Nutritive value and antinutritional factors in different varieties of *Sesbania* seeds and their morphological fractions. **Food Chemistry**, v. 73, p. 421-431, 2001.

43. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola**. 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>.
44. IQBAL, A., KHALIL, I. A., ATEEQ, N., KHAN, M. S. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 331-335, 2006.
45. JUNIOR, O. DE A., LACERDA, C. F., SILVA, F. B., SILVA, F. L. B., BEZERRA, M. A., GHEYI, H. R. Produtividade do feijão-de-corda e acúmulo de sais no solo em função da fração de lixiviação e da salinidade de água de irrigação. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. 27, p. 702 – 713, 2007.
46. KAPLAN, A. The determination of urea, ammonia and urease. In: GLICK, D. (ed.). **Methods of Biochemical Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1969. p. 311-314
47. KAPTSO, K. G., NJINTANG, Y. N., KOMNEK, A. E., HOUNHOUIGAN, J., SCHER, J., MBOFUNG, C. M. F. Physical properties and rehydration kinetics of two varieties of cowpea (*Vigna unguiculata*) and bambara groundnuts (*Voandzeia subterranea*) seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 91-99, 2008.
48. KOSHIYAMAI. Storage proteins of soybean. In: GOTTSCHALK, W., MULLER, H. P. (Eds.). Seed Proteins. **Biochemistry, Genetics, Nutritive Value**. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers: The Hague, 1983. p. 428-450.

49. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 689-685, 1970.
50. LAJOLO, F. M., SANTOS, A. C., WILSON, E. D. Proteínas e aminoácidos. In: OLIVEIRA, J. E. D., SANTOS, A. C., WILSON, E. D. (eds.). **Nutrição Básica**. São Paulo: Savier, 1989, cap. 6, p. 29-65.
51. LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 31-67, 1994.
52. LIMA, M. P. L., OLIVEIRA, J. V., BARROS, R., TORRES, J. B., GOMÇALVES, M. E. C. Estabilidade da resistência de genótipos de caupi a *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) em gerações sucessivas. **Scientia Agrícola**, v. 59, n. 2, p. 275 – 280, 2001
53. LIS, H., SHARON, N. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Methods in Enzymology**, v. 28, p. 360-368, 1972.
54. MACEDO, M. L. R., ANDRADE, L. B. S., MORAES, R. A., XAVIER-FILHO, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 89-94, 1993.
55. MAHAN, L. K., ESCOTT-STUMP, S. Proteins. In _____. **Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy**. W. B. Saunders Company, 9 ed., cap. 5, p. 63-76, 1996.

56. MAIA, A. A. B. **Urease de sementes de soja e sua toxicidade para animais superiores - Uma evidência para o seu papel de defesa na planta.** 2008, 112p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
57. MAIA, F. M. M. Proximate composition, amino acid content and haemagglutinating and trypsin-inhibiting activities of some Brazilian *Vigna unguiculata* (L) Walp cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. 453-458, 2000.
58. MAIA, F. M. M., **Genótipos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] susceptíveis e resistentes ao CpSMV (Vírus do mosaico severo do feijão-de-corda) – caracterização bioquímica e avaliação nutricionais das proteínas.** 2003, 158p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
59. MARCONI, E., NG, N. Q., CARNOVALE, E. Protease inhibitors and lectins in cowpea. **Food Chemistry**, v. 47, p. 37-40, 1993.
60. MARTINS, N. F. Predição de Proteínas Alergênicas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Documentos**, 15p., 2006.
61. MAUREEN, G. B., FERGUSON, A. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and “biologically filtered” antigen. **Immunology**, v. 57, p. 627-630, 1986.

62. MELO, V.M.M., XAVIER-FILHO, J., LIMA, M. G. S., DANON-PROUVOST, A. Allergenicity and tolerance from Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). **Food Agricultural Immunology**, v. 6, p. 185-195, 1994.
63. MENDOZA, E. M. T., ADACHI, M., BERNARDO, A. E. N., UTSUMI, S. Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] globulins: purification and characterization. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 1552-1558, 2001.
64. MILLER, D. S., BENDER, A. E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **The British Journal of Nutrition**, v. 9, p. 382-388, 1955.
65. MORAES, J. G. L. **Comportamento de genótipos de feijão-de-corda sob infestação de pragas**. 2007, 52p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
66. OREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783 – 787, 1977.
67. MOSCHEM, J. A. A., BRITO, J. P., SANTOS, R.F., OLIVEIRA, J.E. M., DE BORTOLI, S. A. Determinação de índices ecológicos através da distribuição espacial da população de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado *Vigna unguiculata*. **O Biológico**, v. 68, n.2, p.1-4, 2006.
68. MOTA, A. C., DAMATTA, R. A., LIMA FILHO, M., SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **Journal of Insect Physiology**, v. 49, pp. 873-880, 2003.

69. MOTA, I., WONG, D., Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse anti-sera during the course of immunization. **Life Science**, v. 8, p. 813-820, 1969.
70. MUBARAK, A. E. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. **Food Chemistry**, v. 89, p. 489-495, 2005.
71. MURAD, A. M., LAUMANN, R. A., MEHTAB, A., Screening and secretomic analysis of enthomopatogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 145, pp. 333-338, 2007.
72. NG, N. Q. Recent developments in cowpea germplasm collection, conservation, evaluation and research at the genetic resource unit, IITA. In NG, N. Q., MONTI, L. M. (eds.). **Cowpea Genetic Resources**. Thailand: Amarin Printing Group Co. Ltd., cap. 2, p. 13 – 29, 1990.
73. NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Plantas transgênicas: avaliação e biossegurança, 1999. Disponível em: http://www.acd.ufrj.br/consumo/leituras/lg_nodari_1999.rtff
74. NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 1, pp. 105-116, 2003.
75. NORTON, G. Proteinase inhibitors. In: D'MELLO, J. P. F. DUFFUS, C. M. (ed) Toxic Substances in Crop Plants. Edinburgh: The Scottish Agricultural College, cap. 4, p. 69-106, 1991.

76. NUTTI, M. R., WATANABE, E., TANNO, G., SOUZA, T. L. Aspectos da introdução da biotecnologia no comércio internacional. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/producao intelectual/obras_intelectuais/80_obraIntelectual.pdf.
77. OLIVEIRA, J. T. A., PINTO, V. P. T., VASCONCELOS, I. M., FERNANDES, C. F., RAMOS, M. V., FERREIRA, F. V. A., RIOS, F. J. B. In vitro and in vivo digestibility of the albumin and globulin fractions of eight Brazilian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1823-1830, 2004
78. OLIVEIRA, L., CANUL, R. R., PEREIRA-PACHECO, F., COCKBURN, SOLDANI, F., MCKENZIE, N. H.; DUNCAN, M., OLIVEIRA-NOVOA, M. A., GRANT, G. Nutritional and physiological responses of young growing rats to diets containing raw cowpea seed meal, protein isolate (Globulins), or starch. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 51, p. 319-325, 2003.
79. OLIVEIRA-CASTILLO, L., PEREIRA-PACHECO, F., POLANCO-LUGO, E., OLIVERA-NOVOA, M., RIVAS-BURGOS, J., GEORGE, G. Composition and bioactive factor content of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) raw meal and protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 112-119, 2007.
80. ONWULIRI, V. A., OBU, J.A. Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* in northern Nigeria. **Food Chemistry**, v. 78, p. 1-7, 2002.

81. OVARY, Z., CALAZZA, S.S., KOJIMA, S. PCA reactions with mouse antibodies in mice and rats. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 48, p. 16-21, 1975.
82. PAIVA, J. B., SANTOS, J. H. R., TEÓFILO, E. M., OLIVEIRA, F. J. Aspectos da cultura do caupi, *Vigna sinensis* (L.) Savi, no Norte e Nordeste do Brasil. **Relatório de Pesquisa**, Departamento de Fitotecnia-UFC, Fortaleza, p. 3-33, 1977.
83. PAULA, S. M. A. **Análise comparativa de das proteínas antinutricionais e/ou tóxicas em genótipos de feijão-de-corda susceptível e resistente ao *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1972)**. 2003, 128p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
84. PEDERSEN, J. **Application of substantial equivalence data collection and analysis**. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Topic 2, 2000. Disponível em: (<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/gm/Bio-04.pdf>).
85. PERREIRA, M. R. P. **Resposta imunológica humoral em camundongos “swiss” alimentados com proteínas de sementes de *Lablab purpureus* (L.) sweet (Mangalô)**. 2000, 82. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

86. PHILLIPS, R. D., MAWATTERS, K. H., CHINNAN, M., HUNG, Y., BEUCHAT, L. R., SEFA-DEDEH, S., SAKYI-DAWSON, E., NGDDY, P., NNANYELUGO, D., ENWERE, J., KOMEY, N. S., LIU, K., MENSA-WILMOT, Y., NNANNA, I. A., OKEKE, C., PRINYAWIWATKUL, W., SAALIA, F. K. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v. 82, v. 193-213, 2003.
87. RAMOS, M. V., AGUIAR, V. C., MELO, V. M. M., MESQUITA, R. O., SILVESTRE, P. P., OLIVEIRA, J. S., OLIVEIRA, R. S. B., MACEDO, N. M. R., ALENCAR, N. M. N. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 115-122, 2007.
88. RANGEL, A., DOMONT, G. B., PEDROSA, C., FERREIRA, S.T. Functional properties of purified viclins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and Pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, p. 5792-5797, 2003.
89. RANGEL, A., SARAIVA, K. S., SCHWENGBER, P.; NARCISO, M. S., DOMONT, G. B., FERREIRA, S. T., PEDROSA, C. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*). **Food Chemistry**, v. 87. p. 491-499, 2004.
90. RIOS, F. J. B. **Efeitos da inclusão da lectina de sementes de *Cratylia floribunda* Mart em dietas para ratos e sua participação no mecanismos de defesa da planta.** 1998, 109p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

91. RIVAS-VEGA, M.E., GOYTORTÚA-BORES, E., EZQUERRA-BRAUER, J. M., SALAZAR-GARCÍA M. G., CRUZ-SUÁREZ, L. E., NOLASCO, H., CIVERA-CERECEDO, R. Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Food Chemistry**, v. 97. p. 41-49, 2006.
92. RUBASINGHEGE, G. R. S., PARANAGAMA, P., ABEYWICKRAMA, K. Physicochemical changes of stored cowpea, *Vigna unguiculata*, treated with selected essential oils to control cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 4, p. 41-44, 2006.
93. Sabores & Letras. **O Feijão-caupi combatendo a desnutrição**. Disponível em:
<http://www.saboreseletras.com.br/2008/internas/noticia.asp?idmateria=518>
94. SALES, M. P., GERHARDT, I. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F., XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v. 124, p. 515-522, 2000.
95. SALES, M. P., GOMES, V. M., FERNANDES, K. V. S., XAVIER-FILHO, J. Chitin binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 319 – 326, 1996.
96. SALES, M. P., MACEDO, M. L. R., XAVIER-FILHO, J. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut peptinases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 4, p. 945-950, 1992.

97. SALES, M. P., PIMENTA, P.P., PAES, N. S.,GROSSI-DE-SÁ, M. F., XAVIER-FILHO, J. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structure of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 27-34, 2001.
98. SCHOLZ, G., MANTEUFFEL, R., MIINTZ, K., RUDOLPH, A. Low molecular-weight polypeptides of vicilin from *Vicia faba* L. are products of proteolytic breakdown. **European Journal Biochemistry**, v. 132, p. 103-107, 1983.
99. SEENA, S., SRIDHAR, K. R., RAMESH, S. R. Nutritional and protein quality evaluation of thermally treated seeds of *Canavalia maritima* in the rat. **Nutrition Research**, v. 25, p. 587-596, 2005.
- 100.SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.
- 101.SGARBIERI, V. C. Propriedades nutricionais das proteínas. In:_____. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações e Modificações**. São Paulo: Varela, 1996a. cap. 4, p. 337-386.
102. SILVA, M.R. & SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 1, pp. 3 -9, 2000.
103. SING, B. B., AJEIGBE,H. A., TARAWALI, S. A, FERNANDEZ-RIVERA, S., ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v. 84, p. 169-177, 2003.

104. SING, B. B., CHAMBLISS, O. L., SHARMA, B. Recent advances in cowpea breeding. In: SINGH, B. B., MOHAN RAJ, D. R., DASHIELL, K. E., JACKAI, L. E. N. (eds.). **Advances in Cowpea Research**, cap. 3, Nigeria: Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), cap. 3, p. 30-49, 1997.
105. Sistemas de produção: **Esquema do ciclo fenológico do feijão-caupi**. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/pragas.htm>.
106. Sistemas de produção: *Callosobruchus maculatus* (Fabricius). EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Disponível em:
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/prag_graos_arm.htm
107. SMITH, A. D., DATTA, S. P., HOWARD, S., CAMPBELL, BENTLEY, R. E. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 740p, 1997.
108. SCHAUZU, M. The concept of substantial equivalence in safety assessment of foods derived from genetically modified organisms. **AgBiotechNet**, v. 2, p. 1 – 4, 2000.

109. TEXEIRA, F. M. **Vicilinas de sementes de leguminosas selvagens purificação, caracterização, efeito deletério e mecanismo de ação para bruquídeos e fungos fitopatogênicos.** 2006, 70p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.
110. UCHÔA, A. F., DAMATTA, R. A., RETAMAL, C. A., ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M., SOUZA, S. M., SAMUELS, R. I., SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 52, pp. 169-178, 2006.
111. VAN DER HEIJDEN, P. J., BIANCHI, A. T. J., DOL, M., PALS, J. W., STOCK, W. BOKHOUT, B. A. Manipulation of intestinal immune response against ovalbumin by cholera toxin and its B subunit in mice. **Immunology**, v. 72, p.89-93, 1992.
112. VASCONCELOS, I. M., CAMPELLO, C. C., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. U., SOUSA, D. O. B., MAIA, F. M. M. Brazilian soybean *Glycine max* (L.) Merr. Cultivars adapted to low latitude regions: seed composition and content of bioactive proteins. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 617-625, 2006.
113. VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A. B., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 55-62, 2001.

114. VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. Review. **Toxicon**, v. 44, p. 385-403, 2004.
115. VASCONCELOS, I. M., SIEBRA, E. A., MAIA, A. A. B., MOREIRA, R. A., NETO, M. A. F., CAMPELO, G. J. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 419 – 426, 1997.
116. VIOQUE, J., SANCHEZ-VIOQUE, R., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., BAUTISTA, J., MILLÁN, F. Purification and partial characterization of chickpea 2S albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1405-1409, 1999.
117. WAITZBERG, D. L. Proteínas. In: _____. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. cap. 3, v. 1, p. 35-51.
118. WATANABE, E., NUTTI, M. R. Alimentos geneticamente modificados: avaliação de segurança e melhorias de qualidade em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 1 – 14, 2002.
119. WHO, **Safety aspects of genetically modified foods of plant origin**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Geneva: WHO, 2000. 35p.
120. WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. **Vigna unguiculata**. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Vigna_unguiculata.

121. XAVIER, T. F., ARAÚJO, A. S. F., SANTOS, V. B., CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v. 37, n.2, p. 561-564, 2007.
122. XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F. A. P., ARY, M. B., SILVA, C. P., CARVALHO, M.M.M., MACEDO, M. L. R., LEMOS, F. J. A., GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 37, p. 1139 – 1143, 1989.
123. XAVIER-FILHO, J., COELHO, A. N. Acid proteinases of *Callosobruchus maculatus* and proteinase inhibitors of *Vigna unguiculata*. **Plant Physiology**, v. 65, p. 138, 1980.
124. YANG, Q., GONG, Z-Z. Purification and characterization of an ethylene-induced antifungal protein from leaves of guelder rose (*Hydrangea macrophylla*). **Protein Expression and Purification**, v. 24, p. 76-82, 2002.