

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

Caracterização nutricional de genótipos comerciais de feijão-caupi

Fabíola Vieira Gonçalves

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

Caracterização nutricional de genótipos comerciais de feijão-caupi

FABÍOLA VIEIRA GONÇALVES

*Sob a orientação do Professor
Leonardo Oliveira Médici*

*e Co-orientação do Professor
Carlos Pimentel*

**Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em Ciências, no
Programa de Pós-graduação em Fitotecnia**

**Seropédica, RJ
Março de 2017**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA

G635 Gonçalves, Fabiola Vieira, 1986-
Caracterização nutricional de genótipos comerciais
de feijão-caupi / Fabiola Vieira Gonçalves. - 2017.
80 f.: il.

Orientador: Leonardo Oliveira Medici.
Coorientador: Carlos Pimentel.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Fitotecnia, 2017.

1. frações solúveis. 2. Vigna unguiculata (L.)
Walp.. 3. SDS-PAGE. 4. minerais. 5. fitato. I.
Medici, Leonardo Oliveira, 1967-, orient. II.
Pimentel, Carlos, 1955, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Fitotecnia. IV.
Título.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

FABÍOLA VIEIRA GONÇALVES

**Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.**

TESE APROVADA EM 22/03/2017

Fernanda Reinert Thomé Macrae, (PhD.) UFRJ

Gustavo Ribeiro Xavier, (Dr.) EMBRAPA

Norma Gouvêa Rumjanek, (PhD.) EMBRAPA

Jorge Jacob Neto, (PhD.) UFRRJ

**Leonardo Oliveira Médici, (Dr.) UFRRJ
(Orientador)**

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”*

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela oportunidade do aprimoramento intelectual e moral.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aos professores desta instituição, por minha titulação, pelo aprendizado, pelos amigos que fiz e pelos felizes anos de convívio com pessoas das mais diversas.

Ao Wilson Souza Duarte, amigo, companheiro de vida e também por ser a brisa, quando tudo se faz em tormenta.

Aos meus Pais, irmãos e sobrinhos por serem o meu “porto seguro”, por serem amor, por me darem amor.

À Daniela Pinto Gomes, pela amizade, companheirismo e força que me transmitistes.

Às minhas “meninas” Bella e Máscara que mesmo sem ter a consciência de sua importância, são meu esteio e meu conforto, nos momentos difíceis.

Ao amigo, técnico do laboratório e “equipe de trabalho”, Marcos Paulo, sem sua ajuda esse trabalho não seria possível.

À Salete, por ter me recebido e acolhido na Esalq.

Aos amigos Edilene e Rafael, pela amizade e acolhida em Piracicaba.

Ao amigo Hugo Thaner, que mesmo distante, esteve sempre disposto a me ajudar.

Aos queridos amigos Aline Bhering e Matheus Freitas, pela amizade e por serem presença constante em minha vida.

À Luana Santos, pelo compartilhamento de experiências e pela amizade.

Aos colegas de laboratório (Gepatrik, Rodrigo e David) pela colaboração no trabalho.

Aos meus orientadores, pelo conhecimento transmitido, em especial ao prof. Leonardo Medici pelo convívio e pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À banca examinadora pelas valiosas contribuições.

RESUMO

GONÇALVES, Fabíola Vieira. **Caracterização nutricional de genótipos comerciais de feijão-caupi.** 2017. 80f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamentos de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2017.

Dentre as leguminosas que se destacam pelo elevado teor proteico, está o feijão-caupi, sendo o mais amplamente cultivado na maioria das regiões tropicais em torno do mundo. O perfil nutricional do grão de feijão-caupi é semelhante ao de outras leguminosas com teor de gordura relativamente baixo e conteúdo de proteína total que é de duas a quatro vezes maior do que de cereais e tubérculos. O feijão-caupi é ainda uma excelente fonte de minerais, em especial, ferro e zinco. Entretanto, o uso do grão como alimento rico em proteína de qualidade tem sido limitado pela baixa digestibilidade, pela deficiência de aminoácidos sulfurados e pela presença de fatores antinutricionais como o fitato. Assim, tendo em vista a importância da cultura, especialmente para populações de baixa renda, esse trabalho teve por objetivo estudar as características do grão quanto ao conteúdo proteico, mineral e de fitato em grupo de 18 genótipos e em uma segunda etapa avaliar quatro destes genótipos da planta ao grão com análises de peso fresco da parte aérea e peso seco da parte aérea, raiz e nódulos, número de nódulos, produção de grãos, assim como a caracterização proteica dos grãos. Os resultados obtidos nos dois estudos nos permitiram observar alguns genótipos contrastantes para diferentes características, demonstrando que estes podem tanto serem utilizadas em programas de melhoramento, quanto como fonte de recursos genéticos, podendo ainda serem recomendados conforme o interesse do produtor, para características específicas como composição mineral, conteúdo proteico e/ou produção de grãos. Os resultados obtidos neste estudo não permitiram apontar apenas uma cultivar para atender a todos os caracteres desejáveis nutricionalmente. Entretanto, as cultivares Paulistinha, Novaera e BR17 Gurguéia parecem despontar com melhor equilíbrio entre qualidade e produção de grãos; com bom teor proteico, mineral e conteúdo de aminoácidos solúveis sulfurados.

Palavras chave: frações solúveis, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., SDS-PAGE, minerais, fitato.

ABSTRACT

GONÇALVES, Fabíola Vieira. Nutritional characterization of commercial cowpea genotypes. 2017. 80f. Thesis (Doctor Science in Crop Science). Institute of Agronomy, Departments of Phytotechnology, Federal University of Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2017.

Among the legumes that stand out for their high protein content are cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), being the most widely cultivated in most tropical regions around the world. The nutritional profile of cowpea bean is almost the same as other legumes, with a relatively low-fat content and total protein content that is two to four times higher than cereals and tubers. Cowpea is still an excellent source of minerals, especially iron (Fe) and zinc (Zn). However, the use of grain as food rich in quality protein has been limited by low digestibility, deficiency of sulfur amino acids and presence of antinutritional factors such as phytate. In this way, considering the great number of cultivars and the importance of culture as a protein source, together with the growing scientific interest in its chemical composition (antinutritional and mineral factors), we aimed to investigate and characterize initially 18 genotypes of cowpea in terms of protein content (total protein, soluble fractions and their polypeptides), mineral content and phytate. From these eighteen genotypes four were chosen to have some of their characteristics evaluated in four stages of development: fresh weight of shoot and dry weight of shoot, root and nodules, nodules number, grain yield as well as the grains protein characterization. That way the conjuncture of the data pointed out some contrasting genotypes, demonstrating that these can be used both in breeding programs and as a source of genetic resources, and may be indicated by some specific characteristic such as protein and mineral content or yield. The results obtained in this study did not allow to indicate only one cultivar to meet all the nutritional desirable characteristics. However, the cultivars Paulistinha, Novaera and BR17 Gurguéia seem to emerge with a better balance between quality and grain production with good protein content, mineral content and sulfur amino acids.

Key words: soluble fractions, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., SDS-PAGE, minerals, phytic acid.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Principais características dos genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp | 23 |
| Tabela 2. Frações das proteínas de reserva nos grãos de dezoito genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. Os valores estão expressos em porcentagem da farinha seca | 28 |
| Tabela 3. Teor de minerais nos grãos de dezoito genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. Os dados estão expressos em $g\ kg^{-1}$ e em $mg\ kg^{-1}$ | 32 |
| Tabela 4. Teor de Fitato nos grãos de dezoito genótipos comerciais de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. Os dados estão expressos em $mg\ g^{-1}$ de farinha seca | 34 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Datas de coleta em dias após o plantio (DAP) dos quatro genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp, Seropédica-RJ, Brasil 2016 | 45 |
| Tabela 2. Médias das análises de área foliar, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea e proteína da folha de quatro genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. em quatro diferentes estádios de desenvolvimento, Seropédica-RJ, Brasil 2016 | 49 |
| Tabela 3. Médias das análises de número de nódulos N nódulos e peso seco (PS) de nódulo e raiz, de quatro genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. no estádio fenológico de pré-florescimento, Seropédica-RJ, Brasil 2016 | 49 |
| Tabela 4. Frações das proteínas de reserva nos grãos de quatro genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. Os valores estão expressos em porcentagem da farinha seca | 52 |
| Tabela 5. Teor de aminoácidos solúveis nos grãos de quatro genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. Os dados estão expressos em μg de aminoácido por 100 g de farinha seca | 54 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Etapas de fracionamento de proteínas de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. adaptado de Vasconcelos et al. (2010) 25

Figura 2. Perfil eletroforético SDS-1D de: A- Globulinas; B- Albuminas; C- Prolaminas; D - Glutelina ácida; E- Glutelina básica. A canaleta "P" é a do padrão de massas moleculares; 1- BR17 Gurguéia; 2- BRS Marataoã; 3 - BRS Milênio; 4 - BRS Paraguaçu; 5 - BRS Acauã; 6 - IPA 205; 7 - IPA 206; 8 - Patativa; 9 - Pingo de Ouro-1-2; 10 - Epace 10; 11- Guariba, 12 - BRS Novaera, 13 - BRS Pajeú; 14 - BRS Tumucumaque, 15 - BRS Xiquexique, 16 - IPA 207, 17 - Paulistinha, 18 - BRS Sempre Verde 29

CAPÍTULO II

Figura 1. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. em casa de vegetação no estádio de desenvolvimento vegetativo, Seropédica-RJ, Brasil 2016. 45

Figura 2. Perfil eletroforético SDS-1D de: A- Albuminas; B- Globulinas; C- Prolaminas; D- Glutelina ácida; E- Glutelina básica. A canaleta "P" é a do padrão de massas moleculares; 1- Paulistinha; 2-Novaera; 3 -Espace 10; 4 -Gurguéia. As setas indicam posições de bandas: em A - presença de uma banda extra, em B - menor intensidade da banda, em C e D - supressão de bandas, Seropédica-RJ, Brasil 2016 53

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução Geral | 1 |
| 2. Objetivo Geral | 3 |
| 3. Hipótese | 4 |
| 4. Revisão de Literatura | 4 |
| 4.1. Proteínas de leguminosas | 4 |
| 4.1.1. Características | 4 |
| 4.1.2. Solubilidade e extração de proteínas de reservas | 5 |
| 4.1.3. Proteína x Fitato _ Feijão-caupi | 6 |
| 4.2. Variabilidade genética para conteúdo proteico e composição mineral em grãos de feijão-caupi | 7 |
| 4.3. O ambiente e a composição proteica e mineral dos grãos | 8 |
| 5. Referências Bibliográficas | 12 |

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE 18 GENÓTIPOS COMERCIAIS DE FEIJÃO-CAUPI

| | |
|---|----|
| Resumo | 19 |
| Abstract | 20 |
| 1. Introdução | 21 |
| 2. Metodologia | 22 |
| 2.1. Material Vegetal | 22 |
| 2.2. Extração das proteínas de reserva dos grãos | 24 |
| 2.3. Determinação de proteína | 25 |
| 2.4. SDS-PAGE de proteínas de reserva | 26 |
| 2.5. Determinação de fitato | 26 |
| 2.6. Determinação dos minerais presentes nos grãos | 26 |
| 2.7. Análise estatística | 26 |
| 3. Resultados e Discussão | 27 |
| 3.1. Proteínas de armazenamento de feijão-caupi | 27 |
| 3.2. Minerais | 31 |
| 3.3. Fitato | 33 |
| 4. Conclusão | 35 |
| 5. Referências | 36 |

CAPÍTULO II

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE QUATRO GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI, DA PLANTA AO GRÃO

| | |
|-----------------------------|----|
| Resumo | 41 |
| Abstract | 42 |
| 1. Introdução | 43 |
| 2. Metodologia | 44 |

| | |
|---|----|
| 2.1. Material Vegetal | 44 |
| 2.2. Proteína de folha | 45 |
| 2.3. Análises de Área foliar, peso seco e fresco parte aérea, número de nódulos, peso seco de nódulos e raízes | 46 |
| 2.4. Produção de grãos | 46 |
| 2.5. Extração das proteínas de reserva dos grãos | 46 |
| 2.5.1. Determinação de proteína | 47 |
| 2.6. SDS-PAGE de proteínas de reserva | 47 |
| 2.7. Extração de aminoácidos solúveis dos grãos | 47 |
| 2.8. Separação e determinação da composição de aminoácidos por UPLC | 47 |
| 2.9. Análise estatística | 48 |
| 3. Resultados e Discussão | 48 |
| 4. Conclusão | 55 |
| 5. Referências | 56 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo A - Otimização do método de extração de proteínas de reserva e determinação de proteínas | 59 |
| Anexo B - Protocolo para análise de Fitato | 61 |
| Anexo C - Protocolo para análise de minerais | 63 |
| Anexo D – Anova | 65 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), uma das culturas mais antigas conhecidas pelo homem, teve sua origem e domesticação na África e atualmente é cultivado em todo o mundo. O feijão-caupi pertence à classe das eudicotiledôneas, da ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinea, gênero Vignae e espécie *Vigna unguiculata* (Freire Filho et al., 2011). É uma planta herbácea, autógama e anual, cuja região de origem mais provável é a parte oeste e central da África. As diversas formas cultivadas são conhecidas como feijão de corda, feijão-de-massacar, feijão fradinho, feijão a metro, feijão-da-colônia, etc. (Freire Filho et al. 2005; Frota et al., 2008).

Dentre as leguminosas cultivadas, o feijão-caupi é uma das plantas mais bem adaptadas, versáteis e nutritivas, sendo um importante alimento e componente fundamental dos sistemas de produção nas regiões secas dos trópicos, cobrindo parte da Ásia, Estados Unidos, Oriente Médio, Américas Central e do Sul (Singh et al., 2002), e especialmente na África Subsaariana, onde é consumido de várias formas (Ehlers e Hall, 1997; Timko et al., 2007; Timko and Singh, 2008).

No Brasil, a cultura foi introduzida na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses (Costa et al., 2002; Freire Filho, 1988). Inicialmente sua produção concentrou-se nas regiões Norte e Nordeste do país, onde é tradicionalmente cultivada por agricultores de base familiar; e mais recentemente a cultura encontra-se em processo de expansão na região Centro-Oeste, destacando-se os estados do Mato Grosso (Silva Júnior et al., 2015) e Mato Grosso do Sul (Figura 1), com lavouras altamente tecnificadas de médios e grandes empresários (Freire Filho et al., 2011); e ainda, em menor escala, nas regiões Sul e Sudeste (Rufini et al., 2014). Nas regiões de cerrados do Norte, Nordeste e Centro-Oeste, o feijão-caupi vem sendo incorporado aos arranjos produtivos como safrinha, após as culturas da soja e do arroz; e, em alguns locais, como cultura principal (Zilli et al., 2006; Freire Filho et al., 2011).

Embora seja considerada uma cultura tropical com ampla adaptação aos mais diversos ambientes, o feijão-caupi ainda apresenta patamares de produtividade abaixo da média nacional na região Nordeste do país (Freire Filho et al., 2011), em grande parte, devido ao baixo nível tecnológico empregado na maioria dos cultivos (Ramos, 2011). Isso se exemplifica no fato de que no ano de 2011, foi registrado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, um déficit de 17.576,7 e 102.281,3 toneladas, respectivamente, na oferta do produto, muito em virtude da baixa produtividade obtida nestas regiões, enquanto que na região Centro-Oeste, com cultivos altamente tecnificados, houve um superávit de 38.271,7 toneladas (Freire Filho et al., 2011). Assim, frequentemente as condições ambientais, como disponibilidade de nutrientes e água, época de plantio e especificidades de cada tipo de solo, influenciam direta e/ou indiretamente nas características da planta, podendo alterar o rendimento da cultura. Freire Filho et al. (2003) estudando a interação ambiente/genótipo, relataram que os genótipos Canapuzinho, Espace-10 e BR17 Gurguéia, expressaram o seu melhor potencial produtivo, quando crescidos em ambientes de alta qualidade, apresentando, neste caso, produtividades acima da média geral que foi de 1.062 kg ha⁻¹.



Figura 1. Distribuição aproximada das regiões produtoras de feijão-caupi no Brasil (Freire Filho et al., 2011).

Embora, de maneira geral, a baixa produtividade média da cultura possa ser atribuída a baixa disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente de nitrogênio (Xavier et al., 2017), o feijão-caupi é uma cultura reconhecidamente eficiente no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e quando bem nodulado, pode até mesmo dispensar outras fontes de N e atingir altos níveis de produtividade (Rumjanek et al., 2005). A inoculação em sementes de feijão-caupi com bactérias fixadoras de N_2 , vem sendo utilizada como uma importante estratégia para aumentar a produtividade em diversos agroecossistemas (Costa et al., 2011; Ferreira et al., 2013; Martins et al., 2013).

Nas últimas décadas foram alcançados grandes progressos em genética e melhoramento de plantas de feijão-caupi visando principalmente o aumento da produtividade da cultura. Atualmente, já existem cultivares melhoradas com rendimento de até $2,5\text{ t ha}^{-1}$ no prazo de 60-70 dias em comparação com menos de 1 t ha^{-1} das variedades locais com maturação entre 100 e 140 dias. Essas cultivares foram lançadas em 65 países e causaram aumento significativo na produção global de feijão-caupi (Singh, 2007).

Os programas de melhoramento de feijão-caupi, especialmente os do International Institute of Tropical Agriculture (IITA), até o final de 1990 tinham como foco principal o alto rendimento e resistência a pragas, apesar da comprovada variabilidade genética para proteínas e outras características de qualidade existentes em feijão-caupi (Nielsen, 1993).

Com isso, somente a partir de 2003, um programa sistemático para desenvolver variedades melhoradas de feijão-caupi com níveis mais elevados de teores de proteína e micronutrientes foi iniciado e um progresso considerável foi feito desde então (Singh, 2006). Um total de 2.000 linhagens e germoplasmas foram avaliadas, e os resultados analíticos mostraram significativa variabilidade genética para todos os atributos avaliados, destacando-se os valores para teor de proteína, que variaram entre 21 e 30,7% (Singh, 2006).

As variações no teor de proteínas dos grãos, pode ser reflexo tanto de alterações do ambiente como do genótipo (Popelka et al., 2004); e a qualidade nutricional dessas proteínas, assim como em outras leguminosas, pode ser influenciada pelo gênero, espécie, variedade botânica, tempo de estocagem, tratamento térmico e concentração de fatores antinutricionais, tais como inibidores enzimáticos (de tripsina, quimiotripsina e α -amilase), lectinas, taninos, fitatos e saponinas; que reduzem a digestibilidade e a biodisponibilidade de aminoácidos; que em geral é inferior àquela da proteína de origem animal (Bressani, 1993; Freitas et al., 2004).

O feijão-caupi, tem grande importância, tanto como alimento quanto como gerador de emprego e renda (Freire Filho et al., 2011). É rico em proteínas, minerais, fibras e vitaminas, desempenhando um importante papel na alimentação humana e de animais (Nielsen et al. 1997; Singh, 1997; Frota et al., 2008) além de constituir um componente alimentar básico das populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Alguns aspectos são considerados importantes na escolha do cultivar, quais sejam: ciclo; arquitetura da planta; reação a doenças e pragas e por fim o tipo de produção (Embrapa Meio-Norte, 2003). Além disso, conhecer o perfil nutricional dos grãos, contribui não apenas para uma alimentação mais nutritiva, mas principalmente como um pré-requisito essencial para que estudos envolvendo a herdabilidade e/ou efeitos ambientais, possam ser conduzidos visando a obtenção de cultivares mais nutritivas e que atendam as características desejáveis em um plantio de feijão-caupi.

Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo caracterizar genótipos de feijão-caupi quanto aos aspectos nutricionais do grão, buscando identificar os genótipos mais promissores quanto ao teor proteico, de forma a subsidiar pesquisas futuras na área de melhoramento, que visem a qualidade do grão, sem perdas de outros caracteres de interesse; possibilitando que essas tenham um consolidado referencial teórico.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar genótipos de feijão-caupi quanto ao conteúdo proteico, composição mineral e de fitato, e em um segundo momento tentar relacionar dados de desenvolvimento da planta com características da sua composição, buscando fornecer assim subsídios para seleção e melhoramento de cultivares para melhoria do aspecto nutricional dos grãos de feijão-caupi.

3. HIPÓTESES

1. Diferentes cultivares podem apresentar diferenças quanto ao conteúdo e qualidade proteica, assim como em relação ao conteúdo mineral e de fatores antinutricionais como o fitato.
2. Características relativas a qualidade do grão, podem apresentar correlação com dados morfológicos da planta em seus diferentes estádios de desenvolvimento.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Proteínas de leguminosas

4.1.1. Características

O controle genético do conteúdo total de proteínas em feijoeiro é complexo. A percentagem de proteína não depende somente da expressão dos genes que controlam a síntese e acúmulo da fração de proteína específica. Esta depende de outros fatores que controlam tais genes como absorção de nutrientes, vigor da planta, maturação, produção, tamanho da semente e síntese e acúmulo de amido (Osborn, 1988).

Durante o seu desenvolvimento, as sementes de leguminosas acumulam grandes quantidades de vários tipos de proteínas (Duranti e Gius, 1997; Sales et al., 2000) que representam cerca de 200 g kg⁻¹ (peso seco) em ervilha e feijão, e, até 380-400 g kg⁻¹ em soja ou tremoço (Rubio et al., 2014). Entre essas, estão as proteínas de armazenamento, que são tradicionalmente consideradas como sendo metabolicamente inativas, ou seja, a maioria é desprovida de atividade catalítica e não desempenha nenhum papel estrutural no tecido cotiledonar, sendo armazenadas em organelas ligadas à membrana (células proteicas) e nas células do parênquima cotiledonar (Duranti e Gius, 1997; Sales et al., 2000).

A maior parte das proteínas de armazenamento, e a classe mais abundante em grãos de leguminosas são as globulinas (Rubio et al., 2014). Já as proteínas catalíticas, a maioria das quais pertencem à vasta, mas, menos abundante classe das albuminas, são conhecidas comumente por serem solúveis em água. A fração albumina, é composta principalmente por proteínas enzimáticas, inibidores de protease e amilase, lectinas, lipoxigenases, proteínas de defesa e outras, sendo por várias razões relevantes para a qualidade nutricional/funcional da semente. Entretanto, muitas albuminas também são classificadas como proteínas de reserva. Essas proteínas têm massas moleculares (MM) variando entre 5 e 80 kDa (Duranti e Gius, 1997; Duranti, 2006; Boye et al., 2010).

Dessa forma pode se dizer que as principais proteínas de armazenamento encontradas em leguminosas são globulinas e albuminas, que são tradicionalmente classificadas de acordo com suas propriedades de solubilidade e pelos seus coeficientes de sedimentação (Duranti e Gius, 1997; Rubio et al., 2014).

As globulinas, são solúveis em solução salina e geralmente são classificadas como leguminas (11/12S) ou glicininas (em soja) e as 7/8S, que são conhecidas como vicilinas, convicilinas, β -conglycininas, faseolinhas, canavalinas e outros nomes triviais, dependendo de suas espécies de origem. Ambas são nutricionalmente deficientes em cisteína e metionina (sendo as 7/8S mais do que o 11/12S); e possuem importantes propriedades físico-químicas que são significativas para a sua utilização na composição de alimentos (Wang et al., 2003; Boye et al., 2010).

As proteínas de armazenamento 11S e 7S das leguminosas são compostas de subunidades polimórficas codificadas por famílias multigênicas (Boye et al., 2010). As leguminas 11S possuem estruturas quaternárias hexâmeras com subunidades ácidas (MM de ~ 40 kDa) e básicas (MM de 20 kDa), e são menos susceptíveis à dissociação, exceto a pH ou força iônica muito baixos (Duranti e Gius, 1997; Duranti, 2006; Boye et al., 2010). Enquanto que as vicilinas 7S, possuem estrutura trímera com MM de 175 – 180 kDa e mostram equilíbrio de associação e dissociação dependente da força iônica e do poder iônico; são normalmente proteínas de cadeia simples sem ligações dissulfeto (Duranti e Gius, 1997; Sales et al., 2000; Duranti, 2006; Boye et al., 2010).

Proteínas de ambos os tipos (leguminas e vicilinas) podem coexistir em uma única espécie de leguminosa, embora os níveis relativos possam variar (Gibbs et al., 1989). Outras proteínas encontradas em leguminosas incluem prolaminas e glutelinas (Boye et al., 2010). As prolaminas são solúveis em álcool e são caracterizadas por uma elevada proporção de prolina e glutamina. Já as glutelinas, por outro lado, são solúveis em detergentes ácidos ou alcalinos (Osborne, 1924).

Glutelinas contêm maior concentração de metionina e cisteína do que as globulinas e, portanto, são de interesse nutricional. Consequentemente, alguns pesquisadores sugeriram que a criação de leguminosas com maior teor de glutelina pode ajudar a melhorar sua qualidade proteica (Singh e Jambunathan, 1982).

4.1.2. Solubilidade e extração de proteínas de reservas

A solubilidade das proteínas é influenciada pela composição e sequência dos aminoácidos, pelo peso molecular, conformação e conteúdo dos grupos polares e não polares nos aminoácidos, além de ser afetada por fatores ambientais: força iônica, tipo de solvente, pH, temperatura e condições de processamento (Zayas, 1997). A maioria das proteínas de leguminosas possui baixa solubilidade em meio ácido e alta solubilidade em meio alcalino; que pode ainda ser fortemente reduzida próximo do ponto isoelétrico (pI), geralmente entre pH 4 e 6 (Boye et al., 2010).

No ponto isoelétrico, as proteínas têm carga zero, as forças atrativas predominam e as moléculas tendem a se associar, resultando em insolubilidade. Acima do pI, a carga líquida é negativa e a solubilidade é aumentada. As interações proteína-água aumentam a valores de pH mais elevados ou mais baixos do que o pI porque a proteína carrega uma carga positiva ou negativa (Zayas, 1997).

Ainda de acordo com Zayas (1997) as propriedades de solubilidade são critérios limitantes no desenvolvimento dos parâmetros ótimos para a extração e purificação de proteínas e para a separação das frações proteicas. Por exemplo, baixas concentrações de sais neutros a molaridades da ordem de 0,5-1,0 M podem aumentar a solubilidade das proteínas, mas acima de 0,15 M pode reduzi-la.

As extrações das proteínas de reserva dependem, portanto, diretamente da capacidade de solubilização de cada meio extrator. Com isso, variações no método de extração dessas proteínas podem influenciar na valoração do conteúdo das mesmas. Em sementes de feijão-caupi existe uma predominância de globulinas, seguidas de albuminas, glutelinas ácidas, glutelinas básicas e prolaminas (Vasconcelos et al., 2010).

4.1.3. Proteína x Fitato _ Feijão-caupi

Com relação ao conteúdo total de proteína, o feijão-caupi embora seja reconhecidamente uma cultura com alto teor proteico (Gupta et al., 2010; Avanza et al., 2013), o aproveitamento dessa proteína é considerado baixo comparado ao da proteína de origem animal. Isto porque além da limitação de aminoácidos sulfurados ocorre também a presença de fatores antinutricionais como fitato.

Ácido fítico (conhecido como hexosfato de inositol IP6 ou fitato quando na forma salina) é a principal forma de armazenamento de fósforo e inositol na maioria das sementes de plantas (Reddy et al., 1982; Kumar et al., 2010). A quantidade de fitato varia de 0,50% a 1,89% em cereais (com exceção do arroz polido), a partir de 0,40% para 2,06% em leguminosas, a partir de 2,00% para 5,20%, em sementes oleaginosas, exceto soja e amendoim (agrupadas em leguminosas), e a partir de 0,40% a 7,50% em produtos proteicos (Reddy et al., 1982).

Esse composto influencia as propriedades nutricionais e funcionais de grãos de leguminosas e seus derivados por formarem complexos com proteínas (impedindo a proteólise destas), amino ácidos (Cheryan, 1980; Reddy and Salunkhe, 1981) e minerais (Fe, Zn, Ca, e Mg) (Erdman, 1981; Gonçalves et al., 2016), diminuindo seu aproveitamento quando o alimento é ingerido tanto por humanos como monogástricos devido à ausência da fitase no trato digestivo (Cowieson et al., 2011).

Em geral, a interação do fitato com a proteína é dependente do pH (Cheryan, 1980). A um valor de pH inferior ao ponto isoelétrico das proteínas, os grupos de ácido fosfórico do fitato ligam-se ao grupo catiônico de aminoácidos básicos, por exemplo, arginina, histidina, lisina e formam complexos binários proteína-fitato (Kumar et al., 2010). Estes complexos são considerados insolúveis, uma vez que se dissolvem apenas a pH 3,5. Tais formações complexas podem afetar as estruturas proteicas, o que pode prejudicar a atividade enzimática, a solubilidade e a digestibilidade das proteínas (Kumar et al., 2010).

A síntese de proteínas ocorre no retículo endoplasmático, e está possivelmente associada a síntese de mio-inositol, considerando que o mio-inositol seria fosforilado dentro de corpos proteicos (Greenwood e Bewley, 1984; Herman e Larkins, 1999). Assim, o acúmulo de proteínas está associado ao acúmulo de fitato durante o desenvolvimento dos grãos, podendo compartilhar de alguns mecanismos de regulação. De fato, alguns estudos indicam que há uma correlação entre teores de proteína e de fitato, sendo inclusive um problema em programas de melhoramento que visam baixos teores de fitato, pois observa-se uma queda concomitante no teor de proteína (Greenwood e Bewley, 1984). Porém, até o momento não se tem relato de quais proteínas mais especificamente poderiam estar interagindo diretamente com o fitato, o que é um aspecto interessante e necessário de ser examinado.

4.2. Variabilidade genética para conteúdo proteico e composição mineral em sementes de feijão-caupi

Grãos de leguminosas são uma excelente fonte de minerais essenciais, particularmente ferro, zinco e cálcio; embora as concentrações destes possam variar em resposta a fatores genéticos e ambientais (Wang et al., 2003; Campos-Vega et al., 2010).

O crescente interesse em segurança alimentar aliado a conhecida “fome oculta”, tem estimulado pesquisas no campo da biofortificação de culturas, que, em muitos casos, têm sido traduzidas em amplas seleções de variabilidade natural para identificar genótipos doadores com alto conteúdo mineral (Sparvoli et al., 2015). Estes materiais genéticos têm favorecido o uso para melhoramento de variedades com altos teores de ferro e zinco (Sparvoli et al., 2015). É estimado que mais de 60% das 6 bilhões de pessoas do mundo apresentem deficiência em ferro (Fe) e mais de 30%, em zinco (Zn) (White e Broadley, 2009).

A caracterização e avaliação de germoplasmas de feijão-caupi para identificação de melhores parentais é importante para melhoria das características de interesse em estudos de melhoramento (Gerrano et al., 2015). Programas de intervenção globais focados em aliviar a desnutrição humana, especialmente em áreas tropicais semi-áridas têm as técnicas para aumentar o teor de proteína total e conteúdo de minerais de cultivares de feijão-caupi, como componentes fundamentais desse sistema (Santos e Boiteux, 2013).

Grãos de várias linhagens de feijão-caupi, coletadas em diferentes locais, demonstraram extensa diversidade genética, com variações para o conteúdo de proteínas e minerais. Em geral, sementes de leguminosas, como o feijão, têm concentrações de Zn e Fe mais elevadas do que os grãos de cereais, apresentando, para essa característica, considerável variação genética, que é considerada consistente para diferentes ambientes (White e Broadley, 2005). De acordo com White e Broadley (2005), os teores de Fe e Zn são positivamente correlacionados com o rendimento de grãos, embora independentes deste. Já para teores de proteína; enquanto a maioria das variedades e linhagens possuem média ligeiramente inferior a 25 %, existem linhas de germoplasmas com até 32 % de proteína (Boukar et al., 2011). Proteínas de sementes de 100 linhagens melhoradas desenvolvidas no IITA (International Institute of Tropical Agriculture), variaram entre 23 a 33% na base de peso seco (Nielsen et al., 1993).

O material cultivado no Brasil apresenta teores de proteína no grão entre 21 e 29% o que possibilita a seleção para alto teor proteico, podendo resultar em linhagens nutricionalmente superiores. Existe uma correlação positiva entre o teor de proteína da semente e o teor de metionina e cisteína das proteínas em feijão-caupi (Grangeiro et al., 2005; Bliss et al. 1973). Assim, a variabilidade genética que existe para teor de proteína bruta, pode ser explorada na melhoria da qualidade de grãos (Hall et al., 2003). As estratégias de melhoramento devem buscar aumentar os teores de metionina, cisteína e valina, para elevar o valor nutricional, uma vez que os demais aminoácidos são comumente elevados no feijão-caupi (Grangeiro et al., 2005).

Além disso, estudos indicam que linhagens com alta concentração de proteínas em seus grãos podem transferir este atributo para sua progênie (Boukar et al., 2011). Santos et al. (2012) relatam que os valores de hereditariedade, a presença de efeitos intermediários e aditivos e o número reduzido de genes envolvidos no perfil da proteína de semente de feijão-caupi; indicam que a melhora da qualidade do grão, pode ser alcançada com relativa facilidade pela aplicação de métodos de melhoramento padrão, amplamente utilizados em cultivos com auto-polinização.

Entretanto ainda se tem pouco conhecimento sobre a regulação e a acumulação de proteínas de armazenamento durante o desenvolvimento do grão (Xu et al., 2012).

Santos e Boiteux (2013), com o objetivo de desenvolver novas cultivares biofortificadas de feijão-caupi para o cultivo sob condições tropicais do semi-árido, estudaram linhagens oriundas do cruzamento de três acessos ('IT97K-1042-3', 'IT99K-216-48-1', e 'IT97K-499'), reconhecidos como tendo alto teor de proteína e minerais; com acessos adaptados para o cultivo em áreas tropicais do semi-árido brasileiro (BRS Tapaihum, BRS Pujante e Canapu). As linhagens F6 obtidas do cruzamento, foram avaliadas quanto a proteína total, potássio (K), cálcio (Ca), ferro (Fe), zinco (Zn) e sódio (Na); e diferenças significativas foram encontradas para todas as características; destacando-se o conteúdo de proteína que variou entre 22,5 e 34,1%. Nesse estudo, os autores verificaram ainda por análise de correlação básica, que o aumento no conteúdo total de proteína não teve impacto negativo na produção de grãos. A relação conteúdo proteico e produção de grãos em leguminosas, foi investigada por diversos autores, e em muitos desses trabalhos, embora tenha havido uma correlação negativa entre as duas características, ela não foi significativa (Monti e Grillo, 1983).

O International Institute of Tropical Agriculture (IITA), assim como outros institutos de pesquisa têm desenvolvido linhagens de feijão-caupi com alto teor de proteína e minerais (Singh, 2007). De acordo com Santos e Boiteux (2013), os resultados obtidos até o momento proporcionam perspectivas otimistas, no sentido de alcançar um aumento substancial na concentração destes componentes nutricionais em linhagens elite de distintos programas de melhoramento de feijão-caupi.

4.3. O ambiente e a composição proteica e mineral das sementes

O efeito ambiental geral inclui efeitos climáticos não controlados, tais como temperatura e precipitação e efeitos agronômicos parcialmente controlados, tais como densidade de plantio, adubação e inoculação (Wang e Daun, 2006). A análise do desenvolvimento do potencial de produção durante um período de tempo revela uma mudança na composição dos grãos ou sementes e independentemente da espécie, um aumento no rendimento leva a uma diminuição da relação proteína/amido ou óleo (Wang et al., 2003).

A composição química é um aspecto importante na qualidade da semente, podendo ser influenciada pelas condições sob as quais as sementes se desenvolvem. Embora esta característica seja relativamente constante em algumas espécies, muitas plantas mostram uma plasticidade considerável quanto a composição de suas sementes (Fenner, 1992). A adaptabilidade para um ambiente e a estabilidade de produção sob diferentes condições, é também considerada por ser um fator de progresso genético (Triboi e Triboi-Blondel, 2002).

O teor de proteína parece ser particularmente sensível ao estresse ambiental, como chuva, intensidade da luz, duração da estação de crescimento, duração do dia, temperatura e fatores agronômicos, como densidade de plantas, presença de ervas daninhas ou fertilidade do solo (Wang e Daun, 2006). Wang e Daun (2006) relatam que existe maior variabilidade no teor de proteína em amostras avaliadas dentro de um mesmo ano por um produtor, do que para amostras gerais avaliadas ano a ano; o que segundo os autores, sugere um grande impacto da combinação das condições ambientais, prática agronômicas e fatores genéticos na proteína do grão.

Leguminosas crescidas em ambientes com restrição de água não tem apenas o desenvolvimento do grão afetado, mas também a sua composição (Farooq et al., 2017). A seca induz a inibição da biossíntese proteica, ocasionando perda de qualidade das sementes de leguminosas.

As inibições tanto da participação, como da fixação de N em ambientes de água limitada, reduzem o conteúdo de proteínas em grãos de leguminosas (Singh 2007). Entretanto, o estudo conduzido por Ghanbari et al. (2013), para avaliação do efeito do déficit hídrico sob o conteúdo mineral e proteico em sementes de feijão comum; não revelou efeito significativo da seca sobre o conteúdo de N, e consequentemente não alterou o conteúdo proteico da semente, muito embora tenha havido reduções significativas nos teores de Fe, Zn e P.

Na soja (*Glycine max*), o conteúdo de proteína no grão funciona como uma característica quantitativa (Burton, 1987) sendo influenciado pelos efeitos ambientais (Burton, 1988). Geralmente a característica é muito menos influenciável pelo genótipo do embrião do que pela expressão desse genótipo no ambiente no qual as sementes se desenvolvem (Singh e Hadley, 1968). Isto sugere que processos da planta tais como aquisição de N, translocação, e mobilização de C e N são importantes na determinação da concentração de proteínas nas sementes (Nakasathien et al., 2000).

Triboi e Triboi-Blondel (2002) utilizaram o conceito fonte-dreno para analisar os mecanismos determinantes na composição dos grãos. A fonte de carbono e nitrogênio é função de ambos, clima e do sistema de cultivo, incluindo espécies e/ou cultivares. O nitrogênio assimilado disponível, a nível de grão, é utilizado principalmente para produção de proteínas, as quais são então acumuladas nos tecidos especializados. Ainda de acordo com os autores, a quantidade de nitrogênio no grão é muito mais estável que de matéria seca, sob o efeito da temperatura. O mesmo ocorre sob condições de déficit hídrico, onde a quantidade de proteína no grão permanece estável, enquanto o acúmulo de amido é significativamente reduzido.

A caracterização das proteínas individuais é um requisito fundamental tanto para estudos básicos como estudos aplicados em proteínas de leguminosas (Gupta et al., 2014). O acúmulo de diferentes classes de proteínas de reserva durante o enchimento de grãos, determina em grande parte, o equilíbrio de aminoácidos em sementes maduras e varia de acordo com a disponibilidade de nutrientes como enxofre e nitrogênio. Sementes de leguminosas produzidas em condições limitantes de enxofre, mas com nitrogênio adequado, geralmente apresentam níveis reduzidos de proteínas de reserva ricas em enxofre, e acumulam mais proteínas pobres em enxofre (Burstin et al., 2011).

Esforços vem sendo feitos para entender como os minerais se movem do solo, através da planta, em direção as sementes; com o objetivo de que este conhecimento facilite estratégias para aumentar a densidade mineral nos grãos (Grusak, 2002; Wang et al., 2003).

Estratégias agronômicas para aumentar a concentração de minerais nos tecidos comestíveis das plantas, dependem, em geral, da aplicação de adubos minerais e/ou melhoria da solubilização e da mobilização destes elementos minerais no solo (White e Broadley, 2009). Por exemplo, os minerais Fe, Zn e Cu presentes nos solos, podem ser suficientes para suprir as culturas, desde que estejam fito disponíveis (White e Broadley, 2009). A arquitetura radicular, a exsudação de enzimas e ácidos orgânicos pelas raízes, práticas de cultivos intercalares e microrganismos dos solos, são algumas das formas de se explorar o aumento da aquisição de nutrientes pelas plantas via solo. Outra forma de obter um incremento nas concentrações de elementos minerais é através do

melhoramento genético, que possibilita que as culturas tenham uma maior capacidade de adquirir e acumular esses minerais em suas porções comestíveis.

Minerais, oriundos do solo, devem ser adquiridos e entregues a tecidos vegetativos via xilema em resposta ao processo transpiratório de vários órgãos, assim quando não há transpiração, a necessidade de minerais nos tecidos é suprida, em parte, pela remobilização dos nutrientes de órgãos vegetativos (Wang et al., 2003).

Atualmente a aplicação de fertilizantes nitrogenados, ainda constitui uma das principais formas de fornecimento de N às culturas em geral (Martins et al., 2013); sua maior influência na qualidade do grão é alcançada através do seu efeito sobre a concentração da proteína do grão (Borghi et al., 1995; Debaeke et al., 1996; Gooding e Davies, 1997). A fertilização nitrogenada contribui significativamente para o aumento do teor de proteínas, especialmente quando a taxa de fertilizantes satisfaz tanto o requerimento para rendimento quanto para formação de proteínas (Johnson e Mattern, 1987).

De acordo com Babiker et al. (1995), a aplicação do adubo nitrogenado aumentou significativamente o conteúdo de proteína em sementes de fava, comparado ao controle, que não recebeu adubação. Já para o grão de bico, o uso da adução NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) melhorou não só os níveis de proteínas, mas também os de aminoácidos essenciais (Gupta e Singh, 1982; Williams e Singh, 1987). Nakasathien et al. (2000), relataram que o aumento da concentração externa de N para níveis supra ótimos no estádio de desenvolvimento reprodutivo da soja, pode levar linhagens com produção normal de proteína a aumentarem seu conteúdo proteico.

No cultivo do feijão-caupi, especialmente por se tratar de uma cultura capaz de estabelecer associação simbiótica com bactérias do grupo rizóbio, o que lhe permitem fixar o nitrogênio atmosférico; o uso de fertilizantes nitrogenados tem se mostrado controverso ao longo dos anos.

Existem trabalhos que apontam para um efeito positivo da aplicação de N na cultura, atribuindo melhorias na produção, na produtividade (Carsky e Iwuafor, 1999 apud Abyomi et al., 2008), e no teor de proteínas (Garrido - Lestache et al., 2004; Sebetha et al., 2015); enquanto outros não encontraram resultados significativos para a aplicação do fertilizante, seja para produtividade (Dutra et al., 2012), para os componentes de produção (Martins et al., 2013), ou mesmo para outras variáveis, como número de sementes por vagem, peso de 100 sementes, e produção de sementes por planta (Nursu'aidah et al., 2014).

A nutrição da planta por meio da aplicação de fertilizantes contendo enxofre, pode algumas vezes aumentar concentração de proteína no grão (Garrido - Lestache et al., 2004). Em plantas de feijão guandu, a adição desse nutriente proporcionou um aumento da produção de sementes em 33% e foi acompanhado de aumento significativo na quantidade e na qualidade proteica, com incrementos de metionina e cistina nas sementes (Farrag et al., 1992). Nessas plantas o efeito da adubação sulfurada foi similar ao apresentado pela adubação nitrogenada para conteúdo de proteína no grão (Elsheikh e Elzidany, 1997).

O efeito da nutrição vegetal com nitrogênio e enxofre foi também investigada por Kumar et al. (2013), na qualidade da proteína de armazenamento em sementes de feijão-mungo-verde [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] na maturidade, utilizando diferentes fontes de N e S, quer isoladamente ou em combinações. Os parâmetros de qualidade da proteína, isto é, proteína bruta, proteína total solúvel, aminoácidos contendo enxofre (cisteína e metionina) e várias frações de proteínas (albumina, globulina, glutelina e prolaminas), foram substancialmente aumentados no âmbito de vários tratamentos de enxofre e de nitrogênio. Entre os vários tratamentos testados, a

aplicação do gesso foi o que resultou em maior aumento nos parâmetros de qualidade de proteínas, em comparação com os outros tratamentos.

Em soja, Sharma e Sharma (2014) desenvolveram ensaio semelhante, onde aminoácidos contendo enxofre, metionina e cisteína, aumentaram significativamente para todos os tratamentos em relação ao controle (sem aplicação de N ou S), sendo o aumento máximo observado para a aplicação de ureia sem adição de S. O conteúdo das diferentes frações proteicas, albumina, globulina e glicinina (uma subfração da globulina), aumentaram sob o efeito de N e S, aplicados isoladamente ou em combinação, a partir de 30 dias após o plantio, até à maturidade com acumulação máxima na maturidade em relação ao controle não adubado. A adubação com gesso, também neste trabalho, foi a que apresentou melhor desempenho, aumentando os teores de glicinina, determinando uma melhoria na qualidade nutricional das sementes.

Dessa forma, busca-se entender como os diferentes fatores atuam modificando a qualidade nutricional dos grãos de feijão-caupi. Os grãos do feijão possuem alto teor de proteínas (18-35%) e carboidratos (50-65%), e um padrão de aminoácidos complementar aos presentes nos cereais; o que os torna um componente nutricional potencialmente importante na dieta humana (Prinyawiwatkul et al., 1996), especialmente na nutrição e saúde das populações de baixa renda (Singh et al., 2003). Assim, esforços vêm sendo feitos para aumentar o nível de proteína na semente, o que deve melhorar a qualidade da alimentação da população (Vadivel e Pugalenth, 2010).

5. REFERÊNCIAS

ABYOMI, Y. A. et al. Growth and yield responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genotypes to nitrogen fertilizer (NPK) application in the Southern Guinea Savanna zone of Nigeria. *Asian Journal of Plant Sciences*, v.7, n.2, p.170-176, 2008.

AVANZA, M. et al. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. *LWT-Food Science and Technology*, v. 51, n. 1, p. 148-157, 2013.

BABIKER, E. E. et al. Effect of nitrogen fixation, nitrogen fertilization and viral infection on yield, tannin and protein contents and in vitro protein digestibility of faba bean. *Plant Foods for Human Nutrition*, Dordrecht, v.47, n.3, p.257-263, 1995.

BLISS, F. A. et al. Genetic and environmental variation of seed yield, yield components, and seed protein quantity and quality of cowpea. *Crop science*, Madison, v.13, n.6, p.656-660, 1973.

BORGHI, B. et al. Influence of crop rotation, manure and fertilizers on bread making quality of wheat (*Triticum aestivum* L.). *European Journal of Agronomy*, Oxford v.4, n.1, p.37-45, 1995.

BOUKAR, O. et al. Evaluation of cowpea germplasm lines for protein and mineral concentrations in grains. *Plant Genetic Resources*, Cambridge, v.9, n.4, p.515-522, 2011.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, v. 43, n. 2, p. 414-431, 2010.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans. *Food Reviews International*, Philadelphia, v.9, n.2, p.237-297, 1993.

BURSTIN, J. et al. 20 Improving Protein Content and Nutrition Quality. *Biology and breeding of food legumes*, p. 314, 2011.

BURTON, J. W. Quantitative genetics: Relevance to soybean breeding. p. 211–247. In J.R. Wilcox (ed.) *Soybeans: Improvement, production and uses*. 2nd ed. *Agronomy Monograph* 16. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. 1987.

BURTON, J.W. Development of soybeans with altered protein and oil content. Proc. Am. Seed Trade Assoc., v. 17, p. 46–52, 1988.

CAMPOS-VEGA, R.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAH, B. D. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food research international*, v. 43, n. 2, p. 461-482, 2010.

CHERYAN, M.; RACKIS, J. J. Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 13, n. 4, p. 297-335, 1980.

COSTA, E. M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v.42, n.1, p.1-7, 2011.

COSTA, E. S. et al. Photochemical efficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp.) during recovery from high temperature stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Londrina, v.14, n.2, p.105-110, 2002.

COWIESON A. J.; WILCOCK P.; BEDFORD M. R. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal* v. 67, n. 2, p. 225-236.

DEBAEKE, P. et al. Grain nitrogen content of winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) as related to crop management and to the previous crop. *European Journal of Agronomy*, Oxford, v.5, n.3-4, p.273-286, 1996.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, v. 77, n. 2, p. 67-82, 2006.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, v. 53, n. 1-3, p. 31-45, 1997.

DUTRA, A. S. et al. Produtividade e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi em função da adubação nitrogenada. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v.43, n.4, p.816-821, 2012.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, Oxford, v.53, n.1, p.187-204, 1997.

ELSHEIKH, E.A.E; ELZIDANY, A.A. Effect of Rhizobium inoculation, organic and chemical fertilizers on proximate composition, in vitro protein digestibility, tannin and sulphur content of faba beans. *Food Chemistry*, Londres, v.59, n.1, p.41-45, 1997.

EMBRAPA MEIO-NORTE. Sistemas de Produção, 2. Jan/2003. Acesso em: 28 ago de 2013 Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/cultivares.htm>>.

ERDMAN, L. W. Bioavailability of trace minerals from cereals and legumes. *Cereal Chemistry* 58: 21- 26. 1981.

FAROOQ, M. et al. Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *Journal of Agronomy and Crop Science*, Madison, v.203, n.2, p.81-102, 2017.

FARRAG, A. A.; SHEHATA, A.A.; KANDIL, M.M. The effect of phosphorus and sulphur fertilizers on seed protein of broad bean plants. In: Proceedings Middle East Sulphur Symposium. John Wiley Washington, DC, 1992.

FENNER, M. Environmental influences on seed size and composition. *Horticultural reviews*, v. 13, p. 183-213, 1992.

FERREIRA, L.V. M. et al. Biological nitrogen fixation in production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp., family farming in Piauí, Brazil. *Journal of Agricultural Science*, Toronto, v.5, n.4, p.153-160, 2013.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: Araújo, J. P. P. de; Watt, E. E. (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, p. 26-46, 1988.

FREIRE FILHO, F. R. et al. Adaptabilidade e estabilidade da produtividade de grãos de genótipos de caupi enramador de tegumento mulato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.5, p.591-598, 2003.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

FREIRE FILHO, F. R. et al. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, v. 1, 2011.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, A. B. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 6, p.1682-1687, 2004.

FROTA, K. M. G. et al. Composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), cultivar BRS-Milênio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.28, n.2, p.470-476, 2008.

GARRIDO-LESTACHE, E.; LÓPEZ-BELLIDO, R.J.; LÓPEZ-BELLIDO, L. Effect of N rate, timing and splitting and N type on bread-making quality in hard red spring wheat under rainfed Mediterranean conditions. *Field Crops Research*, Oxford, v.85, n.2, p.213-236, 2004.

GERRANO, A. S. et al. Genetic variability in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. genotypes. *South African Journal of Plant and Soil*, Pretoria, v.32, n.3, p.165-174, 2015.

GHANBARI, A. A. et al. Nitrogen changes in the leaves and accumulation of some minerals in the seeds of red, white and chitti beans (*Phaseolus vulgaris*) under water deficit conditions. *Australian Journal of Crop Science*, Camberra, v.7, n.5, p.706, 2013.

GIBBS, P. E.; STRONGIN, K. B.; MCPHERSON, A. Evolution of legume seed storage proteins-a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. *Molecular biology and evolution*, v. 6, n. 6, p. 614-623, 1989.

GONÇALVES, A. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016.

GOODING, M. J.; Davies, W.P. Wheat Production and Utilization. CAB International, Wallingford, UK. 1997.

GREENWOOD, J.S.; BEWLEY, J.D. Subcellular distribution of phytin in the endosperm of developing castor bean. *Planta*, v.160, p.113-120, 1984.

GRUSAK, M. A. Enhancing mineral content in plant food products. *Journal of the American College of Nutrition*, Amherst, v.21, n. sup3, p.178S-183S, 2002.

GUPTA, P. et al. Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2010.

GUPTA, P. et al. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seed proteins: Heterogeneity in total proteins and protein fractions. *Legume Research: An International Journal*, v. 37, n. 1, 2014.

GUPTA, R. S.; SINGH, B. Mutagenic responses of five independent genetic loci in CHO cells to a variety of mutagens: Development and characteristics of a mutagen screening system based on selection of multiple drug-resistant markers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 94, n. 2, p. 449-466, 1982.

HALL, A. E. et al. Development of cowpea cultivars and germplasm by the Bean/Cowpea CRSP. *Field Crops Research*, Oxford, v.82, n.2, p.103-134, 2003.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell*, v.11, p.601-613, 1999.

JOHNSON, V. A.; MATTERN, P. J. Wheat, rye and triticale. In: Olson, R.A., Frey, K.J. (Eds.), *Nutritional Quality of Cereal Grains: Genetic and Agronomy Improvements*, No. 28. *American Society of Agronomy*, Inc., Madison, WI, USA, pp. 133–182. 1987.

KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.

KUMAR, A. et al. Effect of sulfur and nitrogen nutrition on storage protein quality in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] seeds. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, v.26, n.1, p.86-91, 2013.

GRANGEIRO, B. T. et al. Composição química da semente, cap. 9, p.339-365. In: Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos Ed. Francisco Rodrigues Freire Filho, José Albenizio de Araújo Lima e Valdenir Queiroz Ribeiro – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 519p. 2005.

MARTINS, R. N. L. et al. Nitrogênio e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi inoculado1 Nitrogen and micronutrients on grain yield of cowpea inoculated. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.34, n.4, p.1577-1586, 2013.

MONTI, L. M.; GRILLO, S. Legume seed improvement for protein content and quality. *Plant Foods for Human Nutrition* (Formerly *Qualitas Plantarum*), v. 32, n. 3, p. 253-266, 1983.

NAKASATHIEN, S. et al. Regulation of seed protein concentration in soybean by supra-optimal nitrogen supply. *Crop Science*, Madison, v.40, n.5, p.1277-1284, 2000.

NIELSEN, S. S.; BRANDT, W.E.; SINGH, B.B. Genetic variability for nutritional composition and cooking time of improved cowpea lines. *Crop Science*, Madison, v.33, n.3, p. 469-472. 1993.

NIELSEN, S. S.; OHLER, T.A.; MITCHELL, C.A. Cowpea leaves for human consumption: production, utilization, and nutrient composition. *Advances in cowpea research*, p. 326-332, 1997.

NURSU'AIDAH, H. et al. Growth and photosynthetic responses of long bean (*Vigna unguiculata*) and mung bean (*Vigna radiata*) response to fertilization. *J Anim Plant Sci*, v. 24, n. 2, p. 573-578, 2014.

OSBORNE, T. B. The vegetable proteins (2nd edn.). Longmans Green, London. 1924.

OSBORN, T.C.; BUROW, M.; BLISS, F.A. Purification and Characterization of Arcelin Seed Protein from Common Bean. *Plant Physiology*, v. 86, p. 399-405, 1988.

POPELKA, J. C.; TERRYN, N.; HIGGINS, T. J. V. Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Science*, v. 167, p. 195–206, 2004.

PRINYAWIWATKUL, W. et al. Cowpea flour: a potential ingredient in food products. *Critical Reviews in Food Science e Nutrition*, v. 36, n. 5, p. 413-436, 1996.

RAMOS, H. M. M. Características produtivas, fisiológicas e econômicas do feijão-caupi para grãos verdes sob diferentes regimes hídricos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 111 p., 2011.

REDDY, N. R.; SALUNKHE, D. K. Interactions between phytate, protein, and minerals in whey fractions of black gram. *Journal of Food Science*, v. 46, n. 2, p. 564-567, 1981.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Phytates in legumes and cereals. *Advances in food research*, v. 28, p. 1-92, 1982.

RUBIO, L. A. et al. Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 94, n. 2, p. 280-287, 2014.

RUFINI, M. et al. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutradox. *Biology and fertility of soils*, v. 50, n. 1, p. 115-122, 2014.

RUMJANEK, N.G. et al. Fixação biológica do nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R. et al. (Eds). Feijão-Caupi; avanços tecnológicos. Brasília: EMBRAPA, 2005. p.281-335.

SALES, M. P. et al. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids?. *Plant Physiology*, v. 124, n. 2, p. 515-522, 2000.

SANTOS, C. A. F. et al. Genetic analysis of total seed protein content in two cowpea crosses. *Crop Science*, v. 52, n. 6, p. 2501-2506, 2012.

SANTOS, C. A. F.; BOITEUX, L. S. Breeding biofortified cowpea lines for semi-arid tropical areas by combining higher seed protein and mineral levels. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n.4, p. 6782-6789, 2013.

SEBETHA, E. T.; MODI, A. T.; OWOEYE, L. G. Cowpea crude protein as affected by cropping system, site and nitrogen fertilization. *Journal of Agricultural Science*, v. 7, n. 1, p. 224, 2015.

SHARMA, A.; SHARMA, S. Effect of nitrogen and sulphur nutrition on yield parameters and protein composition in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Journal of Applied and Natural Science*, v. 1, n. 6, p. 402-408, 2014.

SILVA JÚNIOR, E. B. et al. Inserção do Feijão-Caupi no Centro-Oeste e a Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio no Manejo do Solo. *Cadernos de Agroecologia*, v. 9, n. 4, 2015.

SINGH, B. B.; HADLEY, H. H. Maternal Control of Oil Synthesis in Soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. *Crop Science*, v. 8, n. 5, p. 622-625, 1968.

SINGH, B. B. (Ed.). *Advances in cowpea research*. IITA, 1997.

SINGH, B. B. et al. Recent progress in cowpea breeding. In: Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production, p. 22-40, 2002.

SINGH, B. B. et al. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. *Field Crops Research*, v. 84, p. 169–177, 2003.

SINGH, B. B. Cowpea breeding at IITA: highlights of advances and impacts In: Congresso Nacional de feijão-caupi, 1. Reunião Nacional de feijão-caupi, v. 6, 2006.

SINGH, B. B. Recent progress in cowpea genetics and breeding. *Acta Hortic.*, v. 752, p. 69-75, 2007.

SINGH, U.; JAMBUNATHAN, R. Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 31, n. 4, p. 347-354, 1982.

SPARVOLI, F.; BOLLINI, R.; COMINELLI, E. Nutritional value. In: *Grain legumes*. Springer New York, 2015. p. 291-325.

TIMKO, M. P.; SINGH, B. B. Cowpea, a multifunctional legume. *Genomics of Tropical Crop Plants*. Edited by: Moore PH, Ming R. v. 200, p. 227-258, 2008.

TIMKO M. P.; EHLERS J. D.; ROBERTS P. A. Cowpea. In: Kole C (ed.) *Pulses, Sugar and Tuber Crops, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. vol. 3. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 49–67, 2007.

TRIBOI, E.; TRIBOI-BLONDEL, A. M. Productivity and grain or seed composition: a new approach to an old problem invited paper. *European Journal of Agronomy*, v. 16, n. 3, p. 163-186, 2002.

VADIVEL, V.; PUGALENTHI, M. Evaluation of nutritional value and protein quality of an under-utilized tribal food legume. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, v. 9, n.4, p. 791-797, 2010

VASCONCELOS, I. M.; et al. Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. *Journal Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 54–60, 2010.

WANG, N.; DAUN, J. K. Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, v. 95, n. 3, p. 493-502, 2006.

WANG, T. L. et al. Can we improve the nutritional quality of legume seeds?. *Plant Physiology*, v. 131, n. 3, p. 886-891, 2003.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in plant science*, v. 10, n. 12, p. 586-593, 2005.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.

WILLIAMS, P. C.; SINGH, U. Nutritional quality and the evaluation of quality in breeding programmes. In: Saxena, M. C. and Singh, K. B. (eds.) *The Chickpea*. CAB International, p. 329-356, 1987.

XAVIER, Terezinha Ferreira et al. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. *Ciência Rural*, v. 37, n. 2, p. 561-564, 2007.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology*, v. 63, p. 153-182, 2012.

ZAYAS, J. F. Solubility of proteins. In: *Functionality of proteins in food*. Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 6-75.

ZILLI, J. E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE 18 GENÓTIPOS COMERCIAIS DE FEIJÃO-CAUPI

RESUMO

Dentre as leguminosas que se destacam pelo elevado teor proteico está o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), sendo o mais amplamente cultivado na maioria das regiões tropicais. Dessa forma, visto o grande número de cultivares existentes e à importância da cultura como fonte proteica, aliados ao crescente interesse científico pela sua composição química (fatores antinutricionais e minerais), que neste trabalho buscou-se investigar e caracterizar 18 genótipos de feijão-caupi quanto ao seu conteúdo proteico, frações proteicas (globulina, albumina, prolamina, glutelinas básica e ácida), teor de fitato e minerais. O conteúdo total de proteína variou de 21,375 a 29,2%, sendo esses valores referentes aos genótipos BRS Marataoã e Paulistinha. Com relação à concentração de cada fração proteica; a variação foi significativa ($p < 0,05$) apenas para a fração glutelina (básicas e ácidas) dos genótipos de feijão-caupi estudados. Todos os 18 genótipos avaliados apresentaram maior conteúdo de globulina, seguido pela glutelina básica, e o menor conteúdo foi de prolamina. Os genótipos estudados apresentaram grandes semelhanças quanto ao perfil eletroforético das frações proteicas e quanto ao conteúdo mineral, para o qual foram observadas significância apenas para teores de K, Ca, S, Mn e Zn, com destaque para a BRS Paraguaçu que apresentou conteúdo de zinco superior a cultivares que são também recomendadas por essa característica. Os menores teores de fitato foram encontrados em quatro genótipos dos 18 genótipos estudados e foram coincidentes com elevado conteúdo proteico. Embora os resultados não tenham convergido para algumas poucas cultivares, o que facilitaria futuros trabalhos de melhoramento, algumas diferenças pontuais foram encontradas, podendo estas características serem melhores exploradas em trabalhos futuros. Dessa forma ressalta-se as características de conteúdo proteico, mineral e de fitato em que os genótipos mais expressivos foram o Paulistinha e o BRS Marataoã. O Paulistinha apresentou elevado teor de proteínas totais e composição mineral mais homogênea, não diferindo estatisticamente dos genótipos com os maiores teores. Somando-se a isso, o genótipo também apresentou baixo teor de fitato, que embora, de maneira geral, promova melhorias na saúde, é indesejável quando se fala em nutrição real promovida pelos alimentos. Já o cultivar BRS Marataoã, embora apresente bom conteúdo mineral, com elevado teor de zinco, não teve bom desempenho para conteúdo de proteínas totais e para conteúdo de fitato.

Palavras-chave: SDS-PAGE, minerais, fitato, proteínas solúveis, *Vigna unguiculata*

ABSTRACT

Among the legumes that stand out for their high protein content are cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), which are the most widely cultivated in the majority of tropical regions around the world. Considering the large number of genotypes and the importance of this crop as a protein source, together with the growing scientific interest in its chemical composition (antinutritional and mineral factors), the objective of this study was to investigate and characterize 18 cowpea genotypes in terms of their protein content, storage protein fractions (globulin, albumin, prolamin, basic and acid glutelins), and content of phytate and minerals. The total protein content varied from 21.4 to 29.2%, for BRS Marataoã and Paulistinha genotypes, respectively. The variation in concentration of each protein fraction was significant ($p < 0.05$) only for glutelin (basic and acid). All genotypes exhibited higher globulin content, followed by basic glutelin, and the lowest content was prolamin. The genotypes studied showed great similarity in the electrophoretic profile of the protein fractions and in the mineral content, for which only K, Ca, S, Mn and Zn contents were observed statistically differing, especially BRS Paraguaçu, which presented Zn content superior for genotypes that are also recommended for this characteristic. The lowest contents of phytate were found in four genotypes of the 18 genotypes studied and were coincident with high protein content. Although the results did not converge to a few genotypes, some specific differences were found, which might be explored. Therefore, considering total protein, mineral and phytate contents, the genotype Paulistinha was highlighted. Paulistinha exhibited high total protein content and a more homogeneous mineral composition, not statistically differing from the genotypes with the highest mineral contents. In addition, this genotype also showed low content of phytate, which although generally promotes health improvements, has not yet elucidated its interaction with minerals and proteins present in food.

Key words: SDS-PAGE, minerals, phytate, total protein, *Vigna unguiculata*

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 20 espécies de leguminosas são usadas como grãos secos para a nutrição humana por serem consideradas como boas fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas solúveis em água e minerais (Klupšaitė e Juodeikienė, 2015; Sreerama et al., 2012). As leguminosas são uma das principais fontes de proteína da dieta para uma grande parte da população, principalmente na Ásia, África e América do Sul (Jafari et al.; 2016). Além desse fundamental papel, cada vez mais tem surgido provas para mostrar que muitos são os benefícios à saúde pelo consumo de leguminosas. Por exemplo, populações com alta ingestão de leguminosas apresentam menor risco de diabetes, doenças cardiovasculares e obesidade (Jafari et al., 2016).

Dentre as leguminosas que se destacam pelo elevado teor proteico está o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), sendo a mais amplamente cultivada na maioria das regiões tropicais, especialmente no Oeste da África. (Coulibaly e Lowenberg-DeBoer, 2002). Originário da região Sul da África, a cultura atualmente é cultivada em mais de 100 países entre as latitudes 40° N e 30° S (Gonçalves et al., 2016).

De maneira geral o perfil nutricional do grão de feijão-caupi é semelhante ao de outras leguminosas, com teor de gordura relativamente baixo e conteúdo de proteína total que é de duas a quatro vezes maior do que de cereais e tubérculos (Timko e Singh, 2008). As proteínas de reserva presentes no grão são ricas em aminoácidos lisina e triptofano, quando comparadas com as dos grãos de cereais, mas, pobres em metionina e cisteína quando em comparação com proteínas animais (Timko e Singh, 2008).

O feijão-caupi é ainda uma excelente fonte de minerais, em especial, ferro (Fe) e zinco (Zn) (Pereira et. al., 2014). De acordo com Muranaka et al. (2016) existe uma correlação positiva, para genótipos de feijão-caupi, entre conteúdo de proteína total e o conteúdo de Fe e Zn. Os autores relatam também que essa característica tem potencial valor para pesquisas na área de melhoramento, uma vez que possibilita a melhoria do conteúdo de proteína total, Fe e Zn sem interações adversas.

O uso do grão do feijão-caupi como alimento rico em proteína de qualidade e o enriquecimento de farináceos e alimentos funcionais a partir de suas proteínas têm sido limitado pela baixa digestibilidade dos grãos, pela deficiência de aminoácidos sulfurados e presença de fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, oligossacarídeos e compostos fenólicos (Elhardallou et al., 2015; Sreerama et al., 2012).

O fitato ou ácido fítico, é considerado como fator antinutricional por formar complexos com minerais essenciais, como cálcio, zinco, ferro e magnésio, tornando-os biologicamente indisponíveis para absorção (Sandberg et al., 2002) e embora seja a principal forma de armazenamento de fósforo em muitos tecidos de plantas (Kumar et al., 2010), não se encontra biodisponível para humanos (Gonçalves et al., 2016). O fitato tem sido também reportado por formar complexos fitato-proteína, modificando a estrutura das proteínas (O'Dell e De Boland, 1976), o que pode resultar em uma redução na solubilidade, atividade enzimática e digestibilidade proteolítica (Gonçalves et al., 2016). Entretanto alguns potenciais efeitos positivos do fitato têm sido descritos por diferentes autores, tais como propriedades anticancerígenas, antioxidante, atuação na regulação da secreção de insulina; prevenção as doenças cardíacas e ainda na remoção de traços e íons de metais pesados (Kumar et al., 2010; Gonçalves et al., 2016).

Essas propriedades consideradas como promotoras de melhorias na saúde de forma geral e da prevenção de doenças têm atraído cada vez mais o interesse tanto de pesquisadores quanto de fabricantes de alimentos (Jacobs e Steffen, 2003). Esse fitoquímico é característico e abundante em sementes de leguminosas. Nos grãos do feijão-caupi, assemelhando-se aos de outras leguminosas, sua concentração varia de 2,6 a 15,2 g kg⁻¹ (Gonçalves et al., 2016).

O teor de proteína da semente feijão-caupi possui elevada herdabilidade com poucos genes, isso proporciona a possibilidade de desenvolvimento de novas cultivares de feijão-caupi com elevado teor proteico (Ravelombola et al., 2016). Estudos indicam que o conteúdo relativo das frações proteicas e da composição mineral de sementes de feijão-caupi apresentam uma grande variação em função do cultivar (Gonçalves et al., 2016; Kachare et al., 1988). Assim devido ao grande número de cultivares existentes e à importância da cultura como fonte proteica, aliados ao crescente interesse científico pela sua composição química (fatores antinutricionais e minerais); buscou-se, neste trabalho, investigar e caracterizar 18 genótipos de feijão-caupi quanto ao seu conteúdo proteico, frações proteicas (globulina, albumina, prolamina, glutelinas básica e ácida); teor de fitato e minerais.

2. METODOLOGIA

2.1. Material Vegetal

Foram selecionados 18 genótipos comerciais de feijão-caupi, oriundos da coleção do Prof. Carlos Pimentel (UFRRJ), tendo como características: elevada produtividade e alto teor de proteína; além de serem tipos comumente recomendados para o Nordeste do Brasil. Tendo em vista as diferentes origens das sementes pertencentes à coleção, que todos os 18 genótipos foram reproduzidos ao mesmo tempo no campo experimental do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ com o objetivo de uniformizar as condições de cultivo e minimizar diferenças decorrentes do ambiente, tempo e forma de estocagem. Foram avaliados os seguintes genótipos: BR17 Gurguéia; BRS Marataoã; BRS Milênio; BRS Paraguaçu; BRS Acauã; IPA 205; IPA 206; Patativa; Pingo de Ouro-1-2; EPACE 10; BRS Guariba; BRS Novaera; BRS Pajeú; BRS Tumucumaque; BRS Xiquexique; IPA 207; Paulistinha; BRS Sempre Verde (Tabela 1).

Para a extração das proteínas de reserva, os grãos foram secos em estufa de ventilação forçada a 60 °C, por 48h, sendo posteriormente liofilizados e moídos para produção da farinha que posteriormente será utilizada nas análises de proteínas de reserva, composição mineral e conteúdo de fitato.

Tabela 1: Principais características dos genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

| GENÓTIPOS | ORIGEM/ CRUZAMENTO | HÁBITO DE CRESCIMENTO | PORTE | CICLO (dias) | COR DO GRÃO | PRODUTIVIDADE MÉDIA (kg ha ⁻¹) | REFERÊNCIAS |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|----------------------------|--|----------------------------|
| BR17 Gurguéia | BR10 Piauí x CE-315 (Tvu 2331) | indeterminado | enramador | 75 | marrom clara esverdeada | 900 a 1500 | Freire Filho et al., 2008 |
| BRS Marataoã | Seridó x TVx1836-013-J | indeterminado | semi-prostrado | 72 a 77 | marrom clara esverdeada | 933 | Freire Filho et al., 2004 |
| BRS Milênio | seleção planta individual | indeterminado | semi-prostrado | 70 a 75 | branca | 1400 | Freire Filho et al., 2009a |
| BRS Paraguaçu | BR10 Piauí x Aparecido Moita | indeterminado | enramador | 65 a 75 | branca | 890 a 1087 | Alcântara et al., 2002 |
| BRS Acauã | BR10 Gurguéia x Canapu | indeterminado | semi-enramador a enramador | 60 | clara a amarela | 1338 a 1407 | Santos, 2011 |
| BRS Guariba | IT85F-2687 x TE87-98-8G | indeterminado | semi-ereto | 65 a 70 | branca | 870 | Freire Filho et al., 2004 |
| BRS Novaera | TE97-404-1F e TE97-404-3F | indeterminado | semi-ereto | 65 a 70 | branca | 1074 | Gonçalves, 2012 |
| BRS Pajeú | CNCx 405-17F x TE94-268-3D | indeterminado | semi-prostrado | 70 a 75 | marrom clara | 1863 | Freire Filho et al., 2009b |
| BRS Tumucumaque | BRS Guariba x IT87D-611-3 | indeterminado | semi-ereto | 65 a 70 | branca | 1.158,00 | Freire Filho et al., 2009c |
| BRS Xiquexique | Amapá x BRS Paraguaçu. | indeterminado | semi-prostrado | 65 a 75 | branca | 1.072,80 | Vilarinho et al., 2008 |
| BRS Sempre Verde | - | - | | | marrom clara esverdeada | 883 | Santos e Lima, 2015 |
| IPA 205 | - | - | semi-enramador | 75 | marrom claro | 1319 | IPA, 1988 |
| IPA 206 | - | - | semi-ereto | 70 | marrom claro | 1240 | IPA, 1989 |
| Miranda IPA 207 | Vita 3 x CNCx 11-9D | - | semi-prostrado | 60 a 68 | | 3578 a 1611 | Costa et al., 2013 |
| Espace 10 | Seridó x TVu 1888 | indeterminado | semi-enramador | 65 a 75 | marrom | 1000 | Barreto, 1988 |
| Paulistinha | Cultivar local/Juazeiro do Norte – CE | - | - | - | - | 1.070 | Rocha et al., 2011 |
| Patativa | EPACE 10 | indeterminado | semi-prostrado | - | marrom clara | 881 a 2772 | Teixeira et al., 2010 |
| Pingo de Ouro 1-2 | Cultivar local /Iguatu – CE | | semi-prostrado | - | - | 880 | Rocha et al., 2011 |

2.2. Extração das proteínas de reserva dos grãos

Foram retiradas de uma única amostra de farinha, oriunda de grãos de diferentes plantas, 100 mg para cada uma das 3 repetições. As amostras foram tratadas com 1 mL de hexano, à temperatura ambiente durante 15 minutos, com leves agitações, centrifugadas a 12000 RCF por 5 min e deixadas para secar *overnight*. O processo de extração é sequencial, desta forma foi utilizado o precipitado da extração anterior como *pellet* para a extração seguinte.

Durante toda as etapas de extração a amostra foi levemente agitada para auxiliar a solubilização das proteínas. Após a solubilização de cada fração proteica, a amostra foi centrifugada a 12.000 RCF durante 5 minutos, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -20°C para posterior análise.

Para a extração da primeira fração proteica, as globulinas, foi adicionado à farinha seca 1 mL de uma solução 0,5 M de NaCl por 30 minutos a 4°C, este processo foi repetido três vezes. Os sobrenadantes obtidos após cada centrifugação foram misturados e armazenados.

A fração albumina foi extraída submetendo o *pellet* anterior a uma nova extração com 1 mL de água destilada por 30 minutos a 4°C, repetido três vezes. O sobrenadante obtido após a primeira centrifugação foi descartado, e os sobrenadantes da segunda e da terceira centrifugação foram misturados e armazenados.

As prolaminas foram obtidas adicionando-se 0,5 mL de etanol 70% por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi armazenado.

As glutelinas foram obtidas em duas frações. As glutelinas ácidas, extraídas em 1 mL de solução 0,1 M HCl por 30 min à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido por centrifugação foi armazenado. Sequencialmente, as glutelinas básicas foram extraídas em 1 mL de solução 0,1 M NaOH, temperatura ambiente por 30 minutos, com armazenamento do sobrenadante.

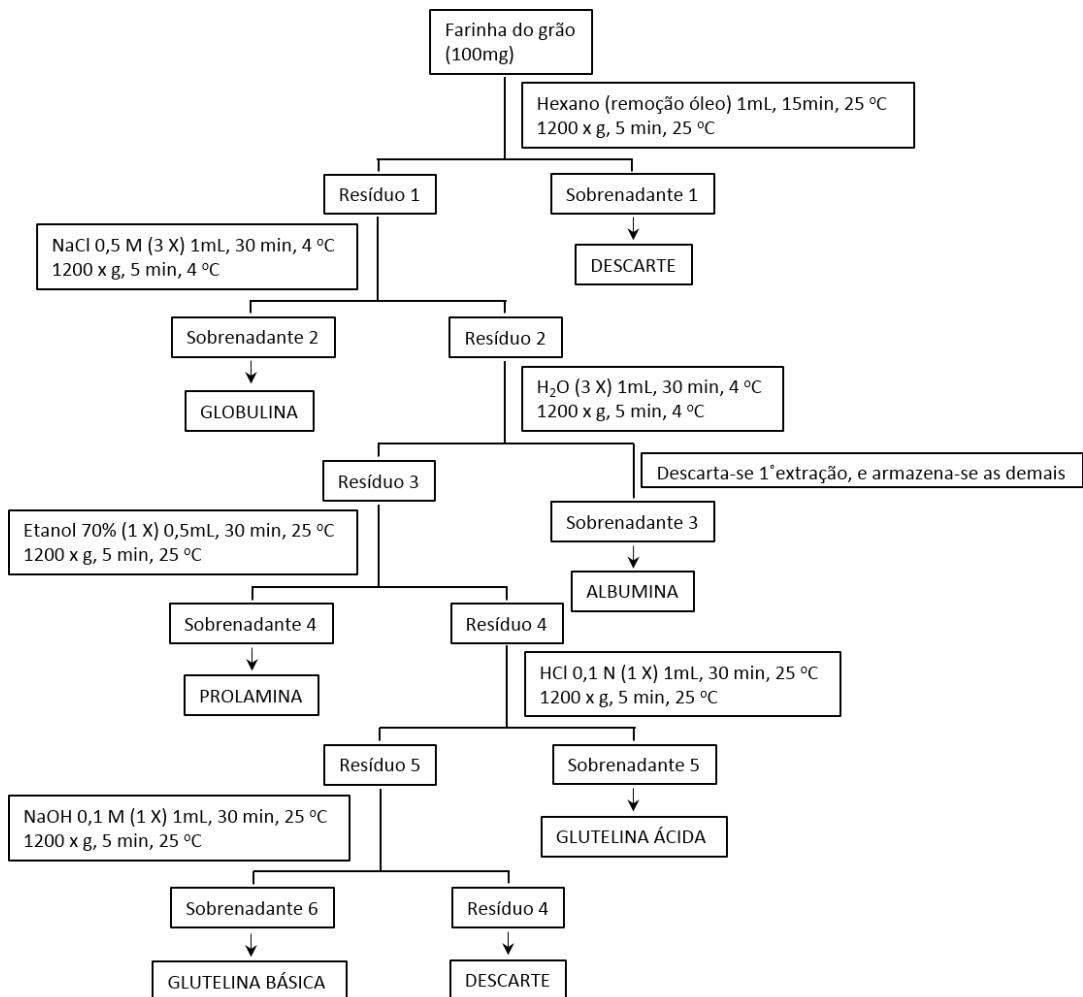


Figura 1. Esquema ilustrando as etapas de fracionamento de proteínas de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

2.3. Determinação de proteína

A concentração de proteína nas frações em todas as amostras foi quantificada utilizando-se Kits da Bio-Rad (Protein Assay e DC Protein Assay). Assim as análises das frações, albumina, globulina, prolamina e glutelina ácida seguiram o método de Bradford (1976) enquanto que para glutelina básica o método utilizado se assemelha ao desenvolvido por Lowry (1951). O soro albumina bovina (BSA) foi usado como padrão. Os valores foram determinados em relação à curva padrão de concentrações conhecidas por meio de regressão linear.

O percentual total de N foi determinado em triplicata pelo método de Kjeldahl e o percentual de proteína total foi calculado multiplicando-se o teor de N por 6,25.

2.4. SDS-PAGE de proteínas de reserva

Os procedimentos para a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram feitos conforme descrito por Laemmli (1970). Após a extração das proteínas, amostras com concentrações conhecidas de proteína de cada fração foram aplicadas aos géis. As condições gerais de corrida, foram determinadas em uma amperagem constante de 15 mA/gel. Marcadores de peso molecular foram aplicados em cada gel para a determinação da massa molecular das proteínas. A coloração dos géis foi realizada utilizando-se a coloração pelo método com prata (Morrissey, 1981).

2.5. Determinação de fitato

O método utilizado foi segundo Latta e Eskin (1980), o qual se baseia na formação de composto ferro-ácido-sulfossalissílico de coloração azul escuro denominado reagente de Wade. Na presença de fitato o ferro é deslocado, reduzindo a intensidade da coloração. A leitura é realizada em espectrofotômetro a 500 nm de comprimento de onda. Os valores foram determinados em relação à curva padrão de concentrações conhecidas de fitato de sódio através de regressão linear.

2.6. Determinação dos minerais presentes nos grãos

A quantificação dos minerais foi realizada pelo Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, seguindo os métodos descritos por Malavolta et al. (1997).

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com teste Scott-Knott, no nível de 5% de probabilidade, para as características quantitativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Proteínas de armazenamento de feijão-caupi

A proporção relativa de cada fração em uma semente afeta fortemente a qualidade do total de proteínas da semente (Johnson e Lay, 1974).

Com relação à concentração de cada fração proteica, expressa em porcentagem da farinha seca; a variação foi significativa ($p < 0,05$) apenas para a fração glutelina (básicas e ácidas) dos genótipos de feijão-caupi estudados (Tabela 2). Todos os 18 genótipos avaliados apresentaram maior conteúdo de globulina, seguido pela glutelina básica, e o menor conteúdo foi de prolamina. Os teores de albumina e glutelina ácida foram muito próximos entre si, mas superiores ao conteúdo de prolamina e inferiores ao de glutelina básica (Tabela 2). A proporção encontrada neste trabalho corrobora com a relatada por Gupta et al. (2010). Entretanto, embora a prevalência da fração globulina, assim como o menor conteúdo de prolaminas estejam em acordo com a literatura (Chan e Phillips, 1994; Vasconcelos et al., 2010; Gonçalves et al., 2016), a fração albumina que apresentou valores entre 0,257 e 0,684 g 100g⁻¹ (Tabela 2), representando portanto o terceiro grupo em quantidade relativa; na literatura é citada como o segundo maior grupo; sendo comum encontrar valores do teor de albumina variando desde 2,5 a 28 % do conteúdo de proteína solúvel total (Chan e Phillips, 1994). Maior teor de albumina pode ser uma característica interessante a ser avaliada, uma vez que, albuminas são ricas em lisina, cisteína e metionina (Clemente et al.; 1998), embora este não seja um consenso na literatura, uma vez que existem trabalhos que não encontraram diferença significativa para os teores de lisina e metionina entre as frações albumina e globulina (Chan e Phillips, 1994). Por outro lado, por representarem a fração mais abundante em semente de feijão-caupi, as globulinas são, assim, responsáveis pelo valor nutricional das sementes (Bressani, 1985).

A variação encontrada na concentração das frações proteicas em relação a literatura, possivelmente deve estar relacionada ao material de origem (diferenças genéticas), conteúdo de proteína na amostra e ao método de extração e determinação das proteínas.

O reduzido teor de albuminas e o maior teor de globulinas encontrados nesse trabalho, pode estar relacionado ao método de extração, uma vez que o método utilizado, embora tenha se baseado em Vasconcelos et al. (2010), traz modificações como a redução dos volumes de extractores utilizados e a eliminação da etapa da diálise. Com isso, os menores valores de albuminas poderiam ser explicados pelo fato de que enquanto no método de Vasconcelos et al. (2010) as albuminas e globulinas são ambas extraídas por uma solução salina (NaCl 0,5 M), sendo só posteriormente separadas pela diálise; na metodologia utilizada aqui, as proteínas extraídas com NaCl (0,5 M), são definidas como globulinas. Enquanto que para se obter a fração albumina, é feita uma nova extração com água destilada. Assim, a eliminação da diálise é possivelmente a maior responsável pelos baixos teores de albumina encontrados e de uma superestimação dos valores de globulina.

Tabela 2. Frações das proteínas de reserva nos grãos de dezoito genótipos comerciais de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

| Genótipos | Frações Proteicas | | | | | | Proteína Total |
|--------------------------|-------------------|----------|-----------|------------------|-----------------|----|----------------|
| | Globulina | Albumina | Prolamina | Glutelina Básica | Glutelina Ácida | | |
| BR17 Gurguéia | 21,730 | a* | 0,508 | a | 0,181 | a* | 23,194 |
| BRS Marataoã | 24,252 | a | 0,570 | a | 0,105 | a | 21,375 |
| BRS Milênio | 23,719 | a | 0,517 | a | 0,113 | a | 22,531 |
| BRS Paraguaçu | 23,401 | a | 0,499 | a | 0,143 | a | 24,756 |
| BRS Acauã | 21,080 | a | 0,425 | a | 0,136 | a | 23,881 |
| IPA 205 | 21,639 | a | 0,257 | a | 0,176 | a | 25,419 |
| IPA 206 | 21,502 | a | 0,320 | a | 0,185 | a | 24,275 |
| Patativa | 25,231 | a | 0,499 | a | 0,199 | a | 23,981 |
| Pingo de Ouro 1-2 | 23,107 | a | 0,406 | a | 0,110 | a | 21,856 |
| Espace 10 | 26,011 | a | 0,502 | a | 0,181 | a | 25,138 |
| BRS Guariba | 27,806 | a | 0,684 | a | 0,151 | a | 25,806 |
| BRS Novaera | 25,956 | a | 0,677 | a | 0,155 | a | 22,488 |
| BRS Pajeú | 24,432 | a | 0,448 | a | 0,155 | a | 24,456 |
| BRS Tumucumaque | 27,710 | a | 0,673 | a | 0,116 | a | 25,456 |
| BRS Xiqueixique | 24,739 | a | 0,383 | a | 0,163 | a | 24,738 |
| IPA 207 | 23,165 | a | 0,346 | a | 0,179 | a | 28,563 |
| Paulistinha | 28,103 | a | 0,532 | a | 0,160 | a | 29,200 |
| BRS Sempre Verde | 24,257 | a | 0,462 | a | 0,169 | a | 23,600 |

*Os valores estão expressos em porcentagem da farinha seca. Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott ($\alpha = 0,05$).

Eletroforese de proteínas de armazenamento tem sido utilizada sucessivamente como ferramenta em estudos biossistemáticos de plantas cultivadas (Kalloo et al., 2001). O conhecimento de variações intraespecíficas é necessário se padrões de proteínas são utilizados adicionalmente para caracterização de espécies (Fotso et al., 1994). Neste trabalho, os perfis de bandas das frações proteicas dos dezoito genótipos revelaram variações em número e intensidade das bandas (Figura 1).

As globulinas de leguminosas são classificadas em dois tipos de acordo com seu coeficiente de sedimentação: globulinas 7/8S, tipo vicilina e 11/12S, tipo legumina (Wang et al., 2003). Vicilinas, são frequentemente proteínas de cadeia simples sem ligação dissulfeto que se agregam formando trímeros de subunidades com massas moleculares variando entre 45 e 60 kDa (Fotso et al., 1994; Sales et al., 2000).

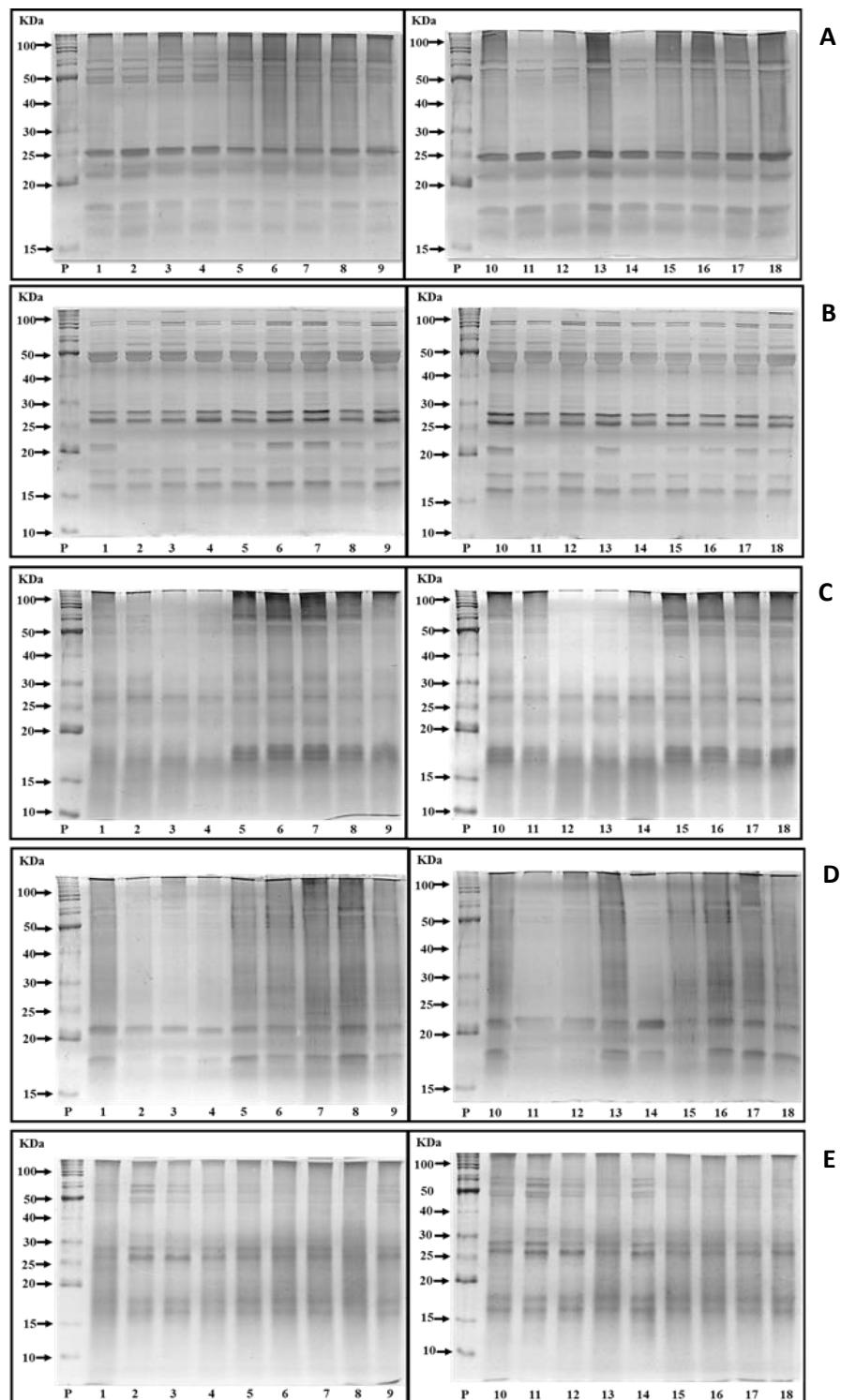


Figura 2. Perfil eletroforético SDS-1D de: A-Albuminas; B- Globulinas; C- Prolaminas; D - Glutelina ácida; E- Glutelina básica. A canaleta “P” é a do padrão de massas moleculares; 1- BR17 Gurguéia; 2- BRS Marataoã; 3 - BRS Milênio; 4 - BRS Paraguaçu; 5 - BRS Acauã; 6 - IPA 205; 7 - IPA 206; 8 – Patativa; 9 - Pingo de Ouro-1-2; 10 – Espace 10; 11- Guariba, 12 - BRS Novaera, 13 - BRS Pajeú; 14 - BRS Tumucumaque, 15 - BRS Xiquexique, 16 - IPA 207, 17 - Paulistinha, 18 - BRS Sempre Verde.

A fração globulina apresentou grande dispersão com relação aos polipeptídios, que apresentaram massa molecular entre 15 e 100 kDa. Os genótipos 2, 3, 11, 12 e 14 suprimiram o polipeptídio de massa molecular com cerca de 20 kDa. Os polipeptídios mais expressivos apresentaram-se com 49 e 50 kDa, massa molecular esta, atribuída as vicilinas (Figura 1). Gupta et al. (2014) avaliando onze genótipos de feijão-caupi, encontraram para globulina uma variação entre 10 e 125 kDa em seus polipeptídios com maior expressão nos que se encontravam na faixa de 35 a 50 kDa, assemelhando-se aos nossos resultados. Por outro lado, Chan e Phillips (1994) e Odeigah e Osanyinpeju (1996), encontraram os principais polipeptídios de globulinas com massas de 65, 64, 58, 56, 50 e 14 kDa.

Kalloo et al. (2001), ao analisar as proteínas do feijão-caupi por SDS-PAGE, concluíram que a técnica de eletroforese foi a mais adequada para distinguir entre variedades e revelar a heterogeneidade molecular das proteínas. Em estudos eletroforéticos sobre proteínas de feijão-caupi, as albuminas mostraram ter um padrão semelhante de distribuição de subunidades (Chan e Phillips, 1994). Nesse sentido, o perfil dos 18 genótipos, apresentou dez diferentes polipeptídeos com massas variando de 10 a 80 kDa. A banda de 25 kDa apresenta maior intensidade em todos os genótipos (Figura 1), diferindo de outros autores que encontraram massa molecular de 99, 94, 91, 86, 32 e 30 kDa para polipeptídeos de albumina mais dominantes (Chan e Phillips, 1994; Fotso et al., 1994).

As globulinas e albuminas têm algumas subunidades polipeptídicas com pesos moleculares iguais ou semelhantes. Isto sugere que, provavelmente, globulinas e albuminas de feijão-caupi têm algumas cadeias polipeptídicas com o mesmo peso molecular ou pode ser uma indicação da extensão da interação ou a contaminação cruzada entre as globulinas e albuminas (Odeigah e Osanyinpeju, 1996).

A análise da fração prolamina, possibilitou identificar um polimorfismo de seus polipeptídios, evidenciado nos genótipos 3, 4, 12, que diferentemente dos demais, não apresentam a banda de 30 kDa; assim como por um outro grupo (genótipos 1, 2, 3, 4, 12, 13 e 14) que apresentam um padrão de bandas com apenas um polipeptídio entre 15 e 20 kDa, sendo este, distinto de ambos os que aparecem nessa faixa nos demais genótipos (Figura 2). Chan e Phillips, 1994 encontraram quatro bandas dominantes de massas 105, 62, 59 e 54 kDa para prolamina, onde apenas a banda de 62 kDa é coincidente com este trabalho. Gupta et al. (2014) encontraram quatro polipeptídios com massa molecular variando entre 7,94 a 56,23 kDa em cinco dos onze genótipos avaliados, enquanto os outros seis genótipos apresentaram apenas um polipeptídio com massa molecular de 56,23 kDa.

Os géis eletroforéticos referentes as glutelinas básica e ácida são muito semelhantes, exceto pela ausência de duas bandas de polipeptídios em todas os genótipos para glutelina ácida; uma vez que, para glutelina básica aparecem quatro polipeptídios, dois com massas entre 15 e 20 e dois com massas entre 25 e 30 kDa, enquanto que para glutelina ácida, para os intervalos de 15 a 20 e de 20 a 25 kDa aparece apenas um polipeptídio. Além disso as variedades 2, 3, 10, 11, 12, 14 apresentam bandas com maior intensidade, para glutelina básica, entre 40 e 70 kDa e os genótipos 1 e 8 não apresentam bandas bem definidas dentro do espectro avaliado (Figura 2). Chan e Phillips (1994) encontraram um amplo espectro de bandas, para glutelinas em geral, com massas molecular de 101, 68, 31 e 29 kDa além de polipeptídios entre 62 e 44 kDa.

O uso da eletroforese em proteínas de sementes tem sido capaz de detectar diferenças qualitativas e quantitativas entre cultivares em várias espécies (Ghafoor et al., 2003). Odeigah e

Osanyinpeju, utilizaram-se da técnica de eletroforese para avaliar a possibilidade de correlação entre a presença/ausência de bandas de polipeptídios específicos com características específicas ou gerais da cultura (como resistência a insetos ou coloração da casca). Entretanto o uso do gel 1D, ou seja, a separação de proteínas em uma única dimensão pode não ser suficiente para distinguir misturas complexas de proteínas, uma vez que a separação é feita com base na massa molecular apenas, assim o uso do gel 2D-PAGE, que considera além da massa molecular o ponto isoelettrico pode em trabalhos futuros ajudar na distinção e identificação de um maior número de proteínas permitindo uma melhor caracterização dos genótipos (Issaq e Veenstra, 1998).

Dentre os 18 genótipos, o conteúdo total de proteína variou de 21,375 a 29,2%, sendo esses valores referentes aos genótipos BRS Marataoã e Paulistinha, respectivamente (Tabela 2). Diversos autores (Gupta et al., 2010; Vasconcelos et al., 2010; Avanza et al., 2013; Harmankaya et al., 2016) obtiveram em seus estudos uma amplitude no teor de proteína dos grãos de 23,7 a 30,1 %. Dessa forma, fica evidente o grande potencial da cultura para estudos de melhoramento, bem como sua mais difundida característica, o alto teor proteico que faz da cultura uma atrativa fonte de proteína em substituição as de origem animal.

Entretanto, é importante se destacar também que de 5,0 a 37% do total de proteínas em feijão-caupi (principalmente globulinas) têm sido reportadas por estarem nutricionalmente indisponíveis (Gonçalves et al., 2016). Embora, peptídeos bioativos com atividade antioxidante sejam obtidos com sucesso da proteólise enzimática de feijão-caupi, indicando um potencial interessante para ser usado como ingrediente em alimentos funcionais (Gonçalves et al., 2016). Dessa forma, ainda existe uma lacuna nos estudos envolvendo proteínas de feijão-caupi e seu verdadeiro papel na nutrição humana. O que se sabe hoje é que proteínas de feijão-caupi, como de outros vegetais, são mais baratas, requerem menos recursos de energia, terra e água do que a produção de proteína animal. Assim, a ênfase em proteínas vegetais pode também resultar em benefícios ecológicos (Peyrano et al., 2016).

3.2. Minerais

O feijão-caupi é uma excelente fonte de cálcio, ferro e zinco, os quais são desejáveis numa perspectiva nutricional. Entretanto estes elementos podem aumentar a dureza da semente e o tempo de cozimento (Singh et al.; 2007). Estudos tem demonstrado uma grande variação no conteúdo destes nutrientes em grãos de feijão-caupi, sendo possível encontrar na literatura teores variando de 8,1 a 118 mg kg⁻¹ para zinco; 6,9 a 218 mg kg⁻¹ para ferro e teores de cálcio entre 0,38 e 10,62 g kg⁻¹ (Gonçalves et al., 2016). Estes intervalos contemplam os valores observados neste estudo.

Tabela 3. Teor de minerais nos grãos de dezoito genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

| Genótipos | P | K | Ca | Mg | S | Cu | Fe | Mn | Zn | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------|---|--------|----|------|---------------------|------|----|-------|---|------|---|-------|---|-------|---|-------|---|
| | g kg ⁻¹ | | | | | mg kg ⁻¹ | | | | | | | | | | | | |
| BR17 Gurguéia | 5,040 | a | 13,388 | a | 0,43 | a | 1,10 | a | 1,471 | a | 5,00 | a | 61,50 | a | 12,00 | c | 52,75 | c |
| BRS Marataoã | 4,994 | a | 12,240 | a | 0,50 | a | 1,05 | a | 1,583 | a | 4,75 | a | 64,25 | a | 11,75 | c | 58,75 | b |
| BRS Milênio | 5,228 | a | 10,327 | c | 0,45 | a | 1,00 | a | 1,539 | a | 4,50 | a | 61,25 | a | 11,25 | d | 54,50 | b |
| BRS Paraguaçu | 4,884 | a | 13,005 | a | 0,43 | a | 1,15 | a | 1,496 | a | 7,00 | a | 65,75 | a | 13,00 | c | 64,25 | a |
| BRS Acauã | 4,430 | a | 11,857 | b | 0,40 | b | 0,95 | a | 1,539 | a | 5,50 | a | 58,50 | a | 9,75 | d | 49,00 | d |
| IPA 205 | 5,046 | a | 12,622 | a | 0,33 | b | 1,10 | a | 1,352 | a | 4,75 | a | 69,00 | a | 12,50 | c | 57,00 | b |
| IPA 206 | 5,630 | a | 11,475 | b | 0,30 | b | 1,00 | a | 1,016 | b | 5,00 | a | 69,00 | a | 9,75 | d | 52,25 | c |
| Patativa | 5,494 | a | 11,858 | b | 0,38 | b | 1,00 | a | 1,209 | b | 4,50 | a | 67,00 | a | 10,00 | d | 55,50 | b |
| Pingo de Ouro 1-2 | 4,540 | a | 12,623 | a | 0,35 | b | 1,10 | a | 0,947 | b | 4,25 | a | 63,00 | a | 8,25 | d | 46,75 | d |
| Espace 10 | 5,364 | a | 13,388 | a | 0,43 | a | 1,15 | a | 1,514 | a | 5,25 | a | 60,50 | a | 14,25 | b | 55,00 | b |
| BRS Guariba | 4,994 | a | 11,475 | b | 0,38 | b | 1,25 | a | 1,502 | a | 4,75 | a | 59,00 | a | 13,75 | b | 47,25 | d |
| BRS Novaera | 4,760 | a | 10,327 | c | 0,38 | b | 1,00 | a | 1,315 | a | 4,25 | a | 62,50 | a | 9,75 | d | 54,50 | b |
| BRS Pajeú | 4,806 | a | 11,858 | b | 0,48 | a | 1,05 | a | 1,427 | a | 5,00 | a | 63,00 | a | 11,00 | d | 50,75 | c |
| BRS Tumucumaque | 5,170 | a | 13,005 | a | 0,45 | a | 1,25 | a | 1,122 | b | 5,50 | a | 60,50 | a | 14,00 | b | 53,50 | c |
| BRS Xiquexique | 5,150 | a | 11,475 | b | 0,45 | a | 1,05 | a | 1,365 | a | 5,75 | a | 60,50 | a | 12,50 | c | 50,75 | c |
| IPA 207 | 4,936 | a | 12,623 | a | 0,48 | a | 1,00 | a | 1,103 | b | 5,75 | a | 60,75 | a | 13,00 | c | 50,75 | c |
| Paulistinha | 5,306 | a | 13,388 | a | 0,43 | a | 1,15 | a | 1,340 | a | 5,25 | a | 63,75 | a | 16,00 | a | 50,25 | c |
| BRS Sempre Verde | 5,001 | a | 11,858 | b | 0,35 | b | 1,10 | a | 1,359 | a | 5,00 | a | 65,00 | a | 10,50 | d | 53,25 | c |

*Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (alpha = 0,05).

O conteúdo de zinco variou de 46,75 a 64,25 mg kg⁻¹ para os genótipos Pingo de ouro 1-2 e BRS Paraguaçu, respectivamente, enquanto que para ferro não houve diferença significativa entre as médias dos 18 genótipos, que variaram de 58,5 a 69 mg kg⁻¹ (Tabela 3). Esses teores diferem dos relatados por Carvalho et al. (2012), que encontraram valores superiores para ferro e inferiores para zinco, neste último com média de 32,83 mg kg⁻¹. Já para cálcio e potássio, sendo este último o mineral mais abundante em sementes feijão-caupi com valores entre 1,9 e 28,9 g kg⁻¹ (Gonçalves et al., 2016), os teores variaram de 0,3 g kg⁻¹ (IPA 206) a 0,5 g kg⁻¹ (BRS Marataoã) para cálcio e de 10,327 g kg⁻¹ (BRS Milênio, BRS Novaera) a 13,388 g kg⁻¹ (BR17 Gurguéia, Espace 10 e Paulistinha) para potássio.

Dos genótipos estudados, dois merecem destaque o BRS Paraguaçu com elevado teor de zinco e o Paulistinha com elevado teor de manganês, ambos também apresentam teores de potássio, cálcio e enxofre elevados. Harmankaya et al. (2016) avaliaram três genótipos de feijão-caupi quanto ao conteúdo de minerais. Os autores encontraram para todos os minerais estudados valores estatisticamente relevantes (exceto potássio, enxofre e cobre). Os teores de potássio, fósforo, enxofre, magnésio, ferro, zinco, manganês e cobre foram adequados para atender a demanda de macro e micronutrientes na dieta humana.

O genótipo BRS Paraguaçu com alto conteúdo de Zn e o genótipo de Paulistinha com alto teor de Mn também exibiram alto teor de K, Ca e S. Os conteúdos de K e Zn foram superiores aos apresentados por Harmankaya et al. (2016) que avaliaram três genótipos de caupi para conteúdo mineral e encontraram quantidades de K, P, Ca, S, Mg, Fe, Zn, Mn e Cu adequadas para atender a demanda de macronutrientes e micronutrientes em dietas humanas de acordo com o National Research Council (1989).

As cultivares Xiquexique e Tumucumaque, recomendadas pela EMBRAPA pelo seu conteúdo de ferro e zinco (teores em torno de 60,57 e 51,63 mg.kg⁻¹, respectivamente), neste trabalho, ambas cultivares, não diferiram das demais em estudo, quanto ao teor de Fe, enquanto que para Zn, foram superadas por sete cultivares (BRS Marataoã, BRS Milênio, BRS Paraguaçu, IPA-205, Patativa, Espace-10 e BRS Novaera). Esses resultados demonstram que todas as cultivares em estudo poderiam ser recomendadas com essa finalidade.

A identificação de linhas apresentando níveis de minerais altos ou baixos é importante, pois esses genótipos podem ser usados em estudos comparativos para decifrar os mecanismos genéticos e fisiológicos subjacentes que regulam o transporte mineral para o desenvolvimento de sementes; assim como, para avaliar se o aumento de um mineral influencia a concentração de outro (Wang et al., 2003). Em estudo de correlação de minerais, com linhagens homozigóticas de *Phaseolus vulgaris*, Beebe et al. (2000) encontraram associações positivas entre a maioria dos minerais.

As sementes de leguminosas embora tenham um bom conteúdo de minerais essenciais, também acumulam significativas quantidades de componentes que reduzem seu valor nutricional pela redução da biodisponibilidade de nutrientes (Sparvoli et al., 2015). O fitato é conhecido como um destes compostos. De acordo com Kumar et al. (2010) a ordem da capacidade dos cátions minerais para formar complexos com fitato in vitro é: Cu²⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺ no pH 3–7. Já com relação à biodisponibilidade de ferro, Hu et al. (2006) não encontraram correlação entre os níveis de fitato e a quantidade ou biodisponibilidade de ferro para feijão comum.

3.3. Fitato

A concentração de fitato variou entre 7,76 e 12,22 mg g⁻¹ (Tabela 4), valores, estes, inferiores ao reportado por Sreerama et al. (2012) que encontraram 14 mg g⁻¹ e superiores ao relatado por Hídvégi e Lászty (2002), que encontraram em média 4,2 mg g⁻¹. Os menores teores de fitato foram observados em quatro genótipos distintos (BRS Novaera, BRS Tumucumaque, IPA 207 e Paulistinha), sendo importante ressaltar que o teor de fitato é influenciado pelo cultivar, condições climáticas e época de cultivo (Hídvégi e Lászty, 2002).

Dos genótipos em estudo, é possível inferir que existe uma tendência de relação inversa com relação ao teor de fitato e ao teor total de proteína, ou seja, genótipos que apresentam maior teor de proteína, tendem a apresentar menor teor de fitato. Esse resultado difere da ideia de Chitra et al. (1995) que consideram que, genótipos com maior conteúdo de proteína estão relacionados a também maior conteúdo de fitato; muito embora os autores ponderem que existe baixa correlação entre estas duas características para feijão guandu e grão de bico.

Até o presente momento, ainda não se tem bem elucidado a importância do complexo fitato-proteína na nutrição humana (Kumar et al., 2010), o que se sabe é que em termos nutricionais o fitato forma um forte complexo com algumas proteínas, impedindo a proteólise destas.

Tabela 4. Teor de fitato nos grãos de dezoito genótipos comerciais de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Os dados estão expressos em mg g⁻¹ de farinha seca.

| Genótipos | Fitato | |
|--------------------------|--------------------|---|
| | mg g ⁻¹ | |
| BR17 Gurguéia | 10,86 | b |
| BRS Marataoã | 9,94 | b |
| BRS Milênio | 10,11 | b |
| BRS Paraguaçu | 10,25 | b |
| BRS Acauã | 10,47 | b |
| IPA 205 | 10,34 | b |
| IPA 206 | 12,22 | a |
| Patativa | 11,64 | a |
| Pingo de Ouro 1-2 | 12,22 | a |
| Espace 10 | 9,36 | b |
| BRS Guariba | 10,74 | b |
| BRS Novaera | 6,80 | d |
| BRS Pajeú | 8,98 | c |
| BRS Tumucumaque | 7,41 | d |
| BRS Xiquexique | 8,651 | c |
| IPA 207 | 7,171 | d |
| Paulistinha | 6,763 | d |
| BRS Sempre Verde | 10,653 | b |

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (alpha = 0,05).

4. CONCLUSÃO

A conjuntura dos dados nos aponta poucos polimorfismos para bandas de proteínas em eletroforese e uma grande semelhança entre os genótipos para conteúdo de frações solúveis. Para as características de conteúdo proteico, mineral e de fitato, os genótipos mais expressivos foram o Paulistinha e o BRS Marataoã. O Paulistinha apresentou elevado teor de proteínas totais e composição mineral mais homogênea, não diferindo estatisticamente dos genótipos com os maiores teores. Somando-se a isso, o genótipo também apresentou baixo teor de fitato, que embora, de maneira geral, promova melhorias na saúde, ainda não tem bem elucidada sua interação com minerais e proteínas presentes nos alimentos. Já o cultivar BRS Marataoã, embora apresente bom conteúdo mineral, com elevado teor de zinco, não teve bom desempenho para conteúdo de proteínas totais e para conteúdo de fitato.

Assim, embora os resultados não tenham convergido para a supremacia de algumas poucas cultivares, o que facilitaria futuros trabalhos de melhoramento, algumas diferenças pontuais foram encontradas, podendo estas características serem melhores exploradas em trabalhos futuros.

5. REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, J. dos P. et al. BRS Paraguaçu, novo cultivar de caupi de porte "enramador" e tegumento branco para o Estado da Bahia. *Revista Ceres*, Viçosa, v.49, p.695-703, 2002.

AVANZA, M. et al. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. *LWT-Food Science and Technology*, v. 51, n. 1, p. 148-157, 2013.

BARRETO, P. D. et al. EPACE-10: nova cultivar de caupi para o Ceará. Fortaleza: EPACE, 1988.

BEEBE, S; GONZALEZ, A. V.; RENGIFO, J. Research on trace minerals in the common bean. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 21, n. 4, p. 387-391, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRESSANI, R. Nutritive value of cowpea in cowpea research production and utilization, ed. *SR Singh e KD Rachie*, p. 355-359, 1985.

CARVALHO, A. F. U. et al. Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 26, n. 1, p. 81-88, 2012.

CHAN, Chi-Wah; PHILLIPS, R. Dixon. Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 42, n. 9, p. 1857-1860, 1994.

CHITRA, U. et al. Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 47, n. 2, p. 163-172, 1995.

CLEMENTE, A. et al. Effect of cooking on protein quality of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. *Food Chemistry*, v. 62, n. 1, p. 1-6, 1998.

COSTA, A. F. et al. Miranda IPA 207, nova cultivar de feijão-caupi para o nordeste brasileiro. *Pesq. agropec. pernamb.*, Recife-PE, v18, n. 1, p. p39-43, 2013.

COULIBALY, O.; LOWENBERG-DEBOER, J. The economics of cowpea in West Africa. In: Proceedings, Third World Cowpea Conference, Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production. Ibadan: IITA. p. 351-366, 2002.

ELHARDALLOU, S. B. et al. Amino Acid Composition of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Flour and Its Protein Isolates. *Food and Nutrition Sciences*, v. 6, n. 9, p. 790, 2015.

FOTSO, M. et al. Molecular heterogeneity of cowpea (*Vigna unguiculata* Fabaceae) seed storage proteins. *Plant Systematics and Evolution*, v. 191, n. 1-2, p. 39-56, 1994.

FREIRE FILHO, F. R. et al. BRS Guariba. Nova cultivar de feijão-caupi para região Meio Norte. Teresina: Embrapa Meio-Norte, folder, 2004.

FREIRE FILHO, F. R. et al. BRS Gurguéia. Teresina: Embrapa Meio-Norte, folder, 2008.

FREIRE FILHO, Rodrigues et al. BRS Milênio e BRS Urubuquara: cultivares de feijão-caupi para a região Bragantina do Pará. *Revista Ceres*, v. 56, n. 6, 2009a.

FREIRE FILHO, F. R. et al. BRS Pajeu: Cultivar de feijão-caupi com grão mulato claro. Teresina: Embrapa Meio-Norte, folder, 2009b.

FREIRE FILHO, F. R. et al. BRS Tumucumaque Cultivar de feijão-caupi com ampla adaptação e rica em ferro e zinco: Teresina: Embrapa Meio-Norte, folder, 2009c.

GHAFOOR, A. et al. Inter-relationship between SDS-PAGE markers and agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pak. J. Bot.*, v. 35, n. 4, p. 613-624, 2003.

GONÇALVES, J. R. P. BRS Novaera: cultivar de feijão-caupi para cultivo em várzeas do Amazonas. Comunicado Técnico 51. São Paulo, 2012.

GONÇALVES, A. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016.

GUPTA, P. et al. Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2010.

GUPTA, P. et al. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seed proteins: Heterogeneity in total proteins and protein fractions. *Legume Research: An International Journal*, v. 37, n. 1, 2014.

HARMANKAYA, M. et al. Some chemical properties, mineral content and amino acid composition of cowpeas (*Vigna sinensis* (L.) Savi). *Quality Assurance and Safety of Crops e Foods*, v. 8, n. 1, p. 111-116, 2016.

HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY, R. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. *Periodica polytechnica. Chemical engineering*, v. 46, n. 1-2, p. 59, 2002

HU, Y. et al. Kaempferol in red and pinto bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) coats inhibits iron bioavailability using an in vitro digestion/human Caco-2 cell model. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 54, n. 24, p. 9254-9261, 2006.

IPA (Recife. PE). Caupi - BR - IPA - 205: nova cultivar de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) para o Estado de Pernambuco. Recife, Folder. 1988.

IPA (Recife, PE) BR - IPA - 206: nova cultivar de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tipo moita para Pernambuco. Recife, Folder. 1989.

ISSAQ, H. J.; VEENSTRA, TD. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*, v. 44, n. 5, p. 697, 2008.

JACOBS, D. R.; STEFFEN, L. M. Nutrients, foods, and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy. *The American journal of clinical nutrition*, v. 78, n. 3, p. 508S-513S, 2003.

JAFARI, M. et al. Physicochemical characterization of a navy bean (*Phaseolus vulgaris*) protein fraction produced using a solvent-free method. *Food chemistry*, v. 208, p. 35-41, 2016.

JOHNSON, V. A.; LAY, C. L. Genetic improvement of plant protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 22, n. 4, p. 558-566, 1974.

KACHARE, D. P.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Nutritional quality of some improved cultivars of cowpea. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 38, n. 2, p. 155-162, 1988.

KALLOO, G. et al. Seed Protein Electrophoresis for Varietal Identification of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Seed Research-New Delhi-*, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2001.

KLUPŠAITĖ, D.; JUODEIKIENĖ, G. Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review. *Chemical Technology*, v. 66, n. 1, p. 5-12, 2015.

KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Assessment of nutritional status of plants: principles and applications. *Piracicaba: Potafós*, 1997.

MORRISSEY, James H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical biochemistry*, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.

MURANAKA, S. et al. Genetic diversity of physical, nutritional and functional properties of cowpea grain and relationships among the traits. *Plant Genetic Resources*, v. 14, n. 01, p. 67-76, 2016.

ODEIGAH, P. G. C.; OSANYINPEJU, A. O. Seed protein electrophoretic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata*) germplasm from IITA gene bank. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 43, n. 6, p. 485-491, 1996.

O'DELL, B. L.; DE BOLAND, A. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oil seed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 24, n. 4, p. 804-808, 1976.

PEREIRA, E. J. et al. Effects of cooking methods on the iron and zinc contents in cowpea (*Vigna unguiculata*) to combat nutritional deficiencies in Brazil. *Food e nutrition research*, v. 58, 2014.

PEYRANO, F.; SPERONI, F.; AVANZA, M. V. Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, v. 33, p. 38-46, 2016.

RAVELOMBOLA, W. S. et al. Evaluation of Total Seed Protein Content in Eleven Arkansas Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Lines. *American Journal of Plant Sciences*, v. 7, n. 15, p. 2288, 2016.

ROCHA, M. de M. et al. Seleção de genótipos de feijão-caupi tipo comercial Canapu no semiárido piauiense. 2011.

SALES, M. P. et al. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids?. *Plant Physiology*, v. 124, n. 2, p. 515-522, 2000.

SANDBERG, Ann-Sofie. Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition*, v. 88, n. S3, p. 281-285, 2002.

SANTOS, C. A. F. et al. BRS Acauã: Cultivar de grão tipo "canapu" para o Vale do São Francisco." *Petrolina: Embrapa Semi-Árido*, 2011.

SANTOS, D. P.; LIMA, L. K. S. Avaliação agronômica de variedades de feijão-caupi em cultivo de sequeiro no município de Coremas-PB. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 10, n. 1, p. 218-222, 2015.

SINGH, R. J.; CHUNG, G. H.; NELSON, R. L. Landmark research in legumes. *Genome*, v. 50, n. 6, p. 525-537, 2007.

SPARVOLI, F.; BOLLINI, R.; COMINELLI, E. Nutritional value. In: *Grain legumes*. Springer New York, p. 291-325, 2015.

SREERAMA, Y. N. et al. Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry*, v. 131, n. 2, p. 462-468, 2012.

TEIXEIRA, I. R. et al. Desempenho agronômico e qualidade de sementes de cultivares de feijão-caupi na região do cerrado. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 1, p. 300-307, 2010.

TIMKO, M. P.; SINGH, B. B. Cowpea, a multifunctional legume. In: *Genomics of tropical crop plants*. Springer New York, p. 227-258, 2008.

VASCONCELOS, I. M. et al. Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. *Journal of food composition and analysis*, v. 23, n. 1, p. 54-60, 2010.

VILARINHO, A. A. et al. BRS Xiquexique: Cultivar de feijão-caupi rica em ferro de zinco para cultivo em Roraima. Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 2008.

WANG, T. L. et al. Can we improve the nutritional quality of legume seeds?. *Plant Physiology*, v. 131, n. 3, p. 886-891, 2003.

CAPÍTULO II

**ESTUDO DE QUATRO GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI, DA PLANTA
AO GRÃO**

RESUMO

As leguminosas estão em segundo lugar, atrás apenas das gramíneas em importância agrícola. O feijão-caupi é uma cultura com múltiplos usos, a planta como um todo pode ser utilizada tanto para consumo humano como para consumo animal. Diante da grande diversidade existente para feijão-caupi, com bom potencial na área de melhoramento para teor de proteína, que recentes trabalhos têm buscado caracterizar esses genótipos. Reunir dados sobre parâmetros nutricionais é crucial; porque isso ajudará os melhoristas de plantas na escolha de linhagens com alto teor de proteína. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo caracterizar quatro genótipos de feijão-caupi, em quatro estádios do seu desenvolvimento (crescimento vegetativo, pré-florescimento, florescimento pleno e enchimento de vagem), assim como avaliar a produção de grãos e evidenciar seu conteúdo proteico. Foram realizadas análises de peso fresco (parte aérea) e seco (parte aérea, raiz e nódulos), número de nódulos, conteúdo de proteína foliar, caracterização das frações solúveis (albumina, globulina, prolamina, glutelinas ácida e básica) e aminoácidos solúveis no grão. Os cultivares BRS Novaera e BR17 Gurguéia se destacaram por apresentar maior produção de grãos associada a elevado teor de proteína solúvel no grão. Além disso a BRS Novaera apresentou maiores teores de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) solúveis, não diferindo quanto ao teor de metionina do cultivar BR17 Gurguéia, e ambas apresentaram polimorfismo de bandas com destaque para o cultivar Novaera que apresentou uma banda extra para albuminas. As informações de polimorfismo são importantes em estudos de seleção assistida ou sobre diferenças alergênicas, podendo assim, serem melhores investigados em trabalhos futuros.

Palavras chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp., proteína do grão, amino ácidos, SDS-PAGE

ABSTRACT

Pulses are second in agricultural importance, behind only to grasses. Cowpea is a crop with multiple uses such as for both human and animal consumption. Due to the great diversity existing for cowpea with good potential in the breeding area for protein content, recent studies have sought to characterize these cultivars. Gathering data on nutritional parameters is crucial because this will help plant breeders in choosing high protein lines. Thus, the objective of this work is to characterize four cowpea cultivars (Paulistinha, BRS Novaera, Espace 10, BR17 Gurguéia) in four stages of development (vegetative growth, pre-flowering, full flowering and pod filling), as well as evaluating the grain protein content. Analysis of the fresh matter (shoot) and dry matter (shoot, root and nodules), number of nodules, soluble fractions quantification and characterization (albumin, globulin, prolamin, acid and basic glutelins) and soluble amino acids were evaluated in the grain. The BRS Novaera and BR17 Gurguéia cultivars exhibited higher soluble grain protein content. BRS Novaera exhibited higher contents of soluble sulfur amino acids (methionine and cysteine), not differing from the BR17 Gurguéia cultivar, for methionine content. Moreover, both cultivars exhibited protein band polymorphism, especially BRS Novaera which exhibited an extra band for albumins.

Key words: amino acid, grain protein, SDS-PAGE, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas estão em segundo lugar, atrás apenas das gramíneas em importância agrícola (Singh et al., 2007). Grãos de leguminosas sozinhos contribuem com 33% das necessidades dietéticas de proteínas dos seres humanos (Graham e Vance, 2003), além disso complementam os cereais não apenas em proteínas, mas também para minerais e vitaminas do complexo B (Elhardallou et al., 2015). Nos países em desenvolvimento, as proteínas vegetais desempenham papéis significativos na nutrição humana, onde a ingestão média de proteínas é menor do que a necessária (Ragab et al., 2004).

O feijão-caupi é uma cultura com múltiplos usos, a planta como um todo pode ser utilizada tanto para consumo humano como para consumo animal (Pottorff et al., 2012). Comumente cultivada em torno do mundo, para produção de sementes e folhas que são consumidas em 18 países da África e sete da Ásia (Malik et al., 2016).

Nas regiões semiáridas, o feijão-caupi é cultivado principalmente por agricultores de subsistência, que utilizam toda a planta, vendendo as sementes frescas ou secas e as vagens e as folhas frescas como legumes (Inaizumi et al., 1999). As sobras das partes verdes ou secas da planta (folhas e caule), podem ainda serem utilizadas como forragem para o gado (Inaizumi et al., 1999). Além desses usos, as folhas de feijão-caupi são consideradas como uma fonte potencial de antioxidantes (Malik et al., 2016) na dieta humana.

As folhas do feijão-caupi são consideradas mais nutritivas que as de outros vegetais, devido à presença de minerais como cálcio e ferro que se encontram mais facilmente biodisponíveis que os encontrados nas sementes, uma vez que, nas folhas não há fitato (forma de armazenamento de fósforo nas sementes) que se ligam aos minerais tornando os biologicamente indisponíveis. (Malik et al., 2016). Segundo Okonya e Maass (2014) e Malik et al. (2016), as folhas de feijão-caupi por serem produzidas mais cedo e em maiores quantidades do que as sementes, podem superar em 15 vezes o conteúdo de proteínas presente nas sementes e, por conseguinte o teor aminoácidos essenciais.

A taxa de acumulo de proteínas depende tanto da capacidade de dreno das sementes, como da habilidade das partes vegetativas de fornecer nitrogênio assimilado a partir da absorção, assimilação, transporte e mobilização (Burstin et al., 2011). Existem estudos apresentando que o N derivado da FBN é mais facilmente movido para as vagens durante o enchimento de grão do que N-nitrato, tanto para soja como para feijão comum (Santos et al. 2013).

O feijão-caupi pode se beneficiar da fixação biológica de nitrogênio, quando associada a estirpes de rizóbios eficazes (Martins et al., 2003). A fixação biológica de nitrogênio tem contribuído para o aumento na produtividade de feijão-caupi, o qual junto com outras tecnologias, tem direcionado a expansão da cultura para regiões de cerrado, competindo com culturas tradicionais de *commodities* como o milho safrinha (Freire Filho et al., 2011).

Embora o ganho em produtividade possa ser uma característica relativamente fácil de ser alcançada, pesquisas desenvolvidas na área de melhoramento, tem demonstrado dificuldade em aumentar o conteúdo proteico sem ocasionar uma redução na produção de sementes (Chung et al., 2003). Entretanto, autores como Fatokun et al. (2000) relatam que o alto rendimento não está correlacionado negativamente com melhores características nutricionais, como o conteúdo proteico e que existe suficiente variabilidade genética para melhorar essas características no feijão-caupi.

A herdabilidade da proteína de semente é geralmente de moderada a alta entre os acessos (20-80%), sugerindo que a seleção para a proteína pode ser bem-sucedida (Burstin et al., 2011). Santos et al. (2012) reportaram que o conteúdo proteico de sementes é controlado por três a sete genes com altíssima herdabilidade de sentido restrito, que é a mais adequada para fins de melhoramento genético por considerar somente a aditividade, ou seja, a porção herdável da variância genética, o que pode ser passado de geração a geração por seleção (Jung et al., 2008).

Assim diante da grande diversidade existente para feijão-caupi, com bom potencial na área de melhoramento para incrementos nos teores de proteína; recentes trabalhos têm buscado caracterizar esses genótipos visando sua aplicabilidade em programas de melhoramento. Reunir dados sobre parâmetros nutricionais é crucial; porque isso ajudará os melhoristas de plantas na escolha de linhagens com alto teor de proteína (Ravelombola et al., 2016). Dessa forma, esse trabalho tem por objetivo caracterizar quatro genótipos de feijão-caupi, em quatro estádios do seu desenvolvimento (crescimento vegetativo, pré florescimento, florescimento pleno e enchimento de vagem), assim como avaliar a produção de grãos e evidenciar seu conteúdo proteico, buscando-se relacionar cultivares nutricionalmente superiores.

2. METODOLOGIA

2.1. Material Vegetal

O estudo foi conduzido no município de Seropédica-RJ (Latitude 22°48'00" S; Longitude 43°41'00" W; altitude de 33,0 m). As plantas foram cultivadas, na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia (Figura 1), em vasos de 8L com terra cuja caracterização química mostrou teores de $P = 2.3$ (mg dm $^{-3}$); $K = 72$ (mg dm $^{-3}$); $Ca = 1,8$ (cmol $_c$ dm $^{-3}$); $Al = 0$ (cmol $_c$ dm $^{-3}$); $Mg = 0,8$ (cmol $_c$ dm $^{-3}$). A adubação seguiu a recomendação do Manual de Adubação e Calagem do Estado do Rio de Janeiro (2012), excetuando-se o fornecimento de nitrogênio (N) (Figura 1). O plantio foi realizado no dia dezesseis de maio de 2016 e as sementes foram inoculadas com SEMIA 6464 (=BR 3262) de *Bradyrhizobium* sp para fornecimento de N. A estirpe foi obtida a partir do banco de germoplasma da Embrapa Agrobiologia.

A escolha dos genótipos para estudo se baseou na popularidade dos genótipos entre os agricultores e pesquisadores (Espace10 e BR17 Gurgueia) e também no perfil proteico, considerando cultivares contrastantes (Paulistinha e Novaera) com base nos dados do capítulo anterior. Assim os genótipos estudados foram: Paulistinha, BRS Novaera, Espace 10, BR17 Gurgueia.



Figura 1. Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), em casa de vegetação no estádio de desenvolvimento vegetativo, Seropédica-RJ, Brasil, 2016.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições. As análises foram realizadas em quatro períodos fenológicos distintos: crescimento vegetativo (do plantio até o aparecimento do primeiro botão floral); prefloração (quando mais de 50% das plantas apresentam pelo menos um botão floral), somente neste estádio foi realizada a avaliação da raiz e sua nodulação; floração plena (quando no mínimo 50% das plantas apresenta uma flor totalmente expandida), enchimento de vagem (inicia-se com o enchimento da primeira vagem), e por fim foi avaliada a produção de grãos e a caracterização das proteínas de armazenamento do grão e seus aminoácidos solúveis. O cultivar Novaera teve suas coletas de florescimento pleno e enchimento de vagem adiantadas em 8 dias, uma vez que se respeitou o estádio fenológico dos cultivares (Tabela 1).

Tabela 1: Datas de coleta em dias após o plantio (DAP) dos quatro genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, Seropédica-RJ, Brasil 2016.

| Cultivares | Crescimento vegetativo | Pré-florescimento | Florescimento pleno | Enchimento de vagem |
|-----------------------|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| ----- DAP ----- | | | | |
| Paulistinha | 21 | 49 | 60 | 68 |
| BRS Novaera | 21 | 49 | 52 | 60 |
| Epace 10 | 21 | 49 | 60 | 68 |
| BR17 Gurguéia. | 21 | 49 | 60 | 68 |

2.2. Proteína de folha

Para quantificar as proteínas solúveis de folha foi utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). A fração da folha analisada corresponde ao folíolo central da terceira folha mais jovem totalmente expandida.

2.3. Análises de área foliar, peso seco e fresco parte aérea, número de nódulos, peso seco de nódulos e raízes

A parte aérea foi separada das raízes em corte no ponto de inserção cotiledonar, próximo à base do caule, e as folhas foram separadas para mensuração da área foliar com um medidor de área foliar portátil LI-3000C (LI-COR, Nebraska USA).

No estádio de pré-florescimento, quando a nodulação foi avaliada, os nódulos foram destacados das raízes, contados e em seguida, nódulos, raízes e parte aérea foram colocados para secagem em estufa com circulação forçada de ar à aproximadamente 60 °C até atingir peso constante ($\pm 72\text{h}$). As avaliações da parte aérea foram repetidas em todos os estádios avaliados.

2.4. Produção de grãos

Para avaliação da produção, os grãos foram secos em estufa a 60 °C, por 48h e posteriormente pesados.

Para a extração das proteínas de reserva, posteriormente a secagem, os grãos foram liofilizados e moídos.

2.5. Extração das proteínas de reserva dos grãos

Foram retiradas de uma única amostra de farinha, oriunda de grãos de diferentes plantas, 100 mg para cada uma das 3 repetições. As amostras foram tratadas com 1 mL de hexano, à temperatura ambiente durante 15 minutos, com leves agitações, centrifugadas a 12000 RCF por 5 min e deixadas para secar *overnight*. O processo de extração é sequencial, desta forma foi utilizado o precipitado da extração anterior como *pellet* para a extração seguinte.

Durante toda as etapas de extração a amostra foi levemente agitada para auxiliar a solubilização das proteínas. Após a solubilização de cada fração proteica, a amostra foi centrifugada a 12.000 RCF durante 5 minutos, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -20°C para posterior análise.

Para a extração da primeira fração proteica, as globulinas, foi adicionado à farinha seca 1 mL de uma solução 0,5 M de NaCl por 30 minutos a 4°C, este processo foi repetido três vezes. Os sobrenadantes obtidos após cada centrifugação foram misturados e armazenados.

A fração albumina foi extraída submetendo o *pellet* anterior a uma nova extração com 1 mL de água destilada por 30 minutos a 4°C, repetido três vezes. O sobrenadante obtido após a primeira centrifugação foi descartado, e os sobrenadantes da segunda e da terceira centrifugação foram misturados e armazenados.

As prolaminas foram obtidas adicionando-se 0,5 mL de etanol 70% por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi armazenado.

As glutelinas foram obtidas em duas frações. As glutelinas ácidas, extraídas em 1 mL de solução 0,1 M HCl por 30 min à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido por centrifugação foi armazenado. Sequencialmente, as glutelinas básicas foram extraídas em 1 mL de solução 0,1 M NaOH, temperatura ambiente por 30 minutos, com armazenamento do sobrenadante.

2.5.1. Determinação de proteína de reserva

A concentração de proteína nas frações em todas as amostras foi quantificada utilizando-se Kits da Bio-Rad (Protein Assay e DC Protein Assay). As análises das frações, albumina, globulina, prolamina e glutelina ácida a seguiram o método de Bradford (Bradford, 1976) enquanto que para a glutelina básica o método utilizado se assemelha ao desenvolvido por Lowry (1951). O soro albumina bovina (BSA) foi usado como padrão. Os valores foram determinados em relação à curva padrão de concentrações conhecidas através de regressão linear.

O percentual total da proteína solúvel foi baseado na soma das frações proteicas.

2.6. SDS-PAGE de proteínas de reserva

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Após a extração das proteínas, amostras com concentrações conhecidas de proteína de cada fração foram aplicadas aos géis. As condições gerais de corrida, foram determinadas em uma amperagem constante de 15 mA/gel. Marcadores de peso molecular foram aplicados em cada gel para a determinação da massa molecular das proteínas. A coloração dos géis foi realizada utilizando-se a coloração pelo método com prata (Morrissey, 1981).

2.7. Extração de aminoácidos solúveis dos grãos

A extração foi feita com MCW (metanol: clorofórmio: água, na proporção 12:5:3) (Azevedo et al., 1990). Um grama de farinha liofilizada dos grãos de cada amostra foi misturado em 10 mL de MCW. A mistura foi deixada durante a noite a 4°C e centrifugada a 10.000RCF por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e misturado com um mL de clorofórmio e 1,5 mL de água para cada quatro mL de MCW utilizado. Centrifugou-se novamente e foi retirado cuidadosamente o estádio aquosa formada que é deixada por uma hora a 38°C e em seguida liofilizada. O “peller” foi ressuspensido em 1 mL de água e a solução de aminoácidos solúveis congelado a -20°C. Quando da análise, as amostras foram filtradas em filtro Millipore em PVDF, de 0,22 µm para remoção das frações de proteínas de reserva albuminas e globulinas que são solúveis em água e então aplicadas em UPLC.

2.8. Separação e determinação da composição de aminoácidos por UPLC

A análise de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi realizada com o sistema Acquity HClass (Waters), coluna BEH C18 (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm), fluxo de 0,7 mL/min e temperatura da coluna de 46°C.

Foram utilizados para a derivatização 70 µL de tampão borato, 10 µL da amostra contendo os aminoácidos e 20 µL do derivatizante (AccQ - fluor). Após, a mistura foi colocada em banho seco a 55°C por 10 minutos e inserida em tubos específicos para injeção da amostra. O volume da injeção foi de 1 µL e a detecção ocorreu através de comprimento de onda de 260 nm.

As concentrações de aminoácidos nas amostras serão determinadas em relação à curva padrão de concentrações conhecidas dos aminoácidos histidina, serina, arginina, glicina, aspartato, glutamato, treonina, alanina, prolina, lisina, tirosina, metionina, valina, isoleucina, leucina e fenilalanina.

2.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com teste de média LSD, no nível de 5% de probabilidade, para as características quantitativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em plantas de feijão-caupi as características morfológicas podem não ser significativamente distintas e normalmente requerem o crescimento das plantas até à maturidade antes da identificação (Mahfouz, 2015). No período de crescimento vegetativo, a BRS Novaera, destacou-se por apresentar os maiores valores para as variáveis analisadas (peso fresco e seco de parte aérea e área foliar), excetuando-se apenas proteína de folha (Tabela 2), que assim como a BR17 Gurgueia apresentou valores significativamente menores, em relação a Paulistinha. Essa característica do BRS Novaera está provavelmente associada à sua precocidade em relação aos demais genótipos avaliados, uma vez que foi o primeiro a alcançar o estádio de enchimento de vagem com diferença de uma semana entre ele e os demais. Variedades de maturação precoce podem desenvolver menos folhas ou progredir através dos diferentes estádios a uma taxa mais rápida. Muito embora, de maneira geral, variedades precoces (65-70 dias) tendem a apresentar alta produção de grãos e baixa produção de forragem (Singh et al., 2003).

No pré-florescimento, houve diferenças significativas para os genótipos, apenas para proteína de folha e peso seco de raiz (Tabela 2), onde o BRS Novaera e o Espace 10 apresentaram o menor e maior conteúdo de proteína de folha, respectivamente, enquanto o Paulistinha apresentou maior peso seco de raiz. As variáveis de número de nódulos e peso seco de nódulos não apresentaram diferenças significativas (Tabela 3). Melo e Zilli (2009) avaliaram a FBN em cinco cultivares de feijão-caupi inoculadas com a estirpe BR 3262, no campo e em casa de vegetação. Dentre os cultivares, o BR17 Gurgueia, também foco desse estudo, apresentou em ambas as situações, número de nódulos muito inferiores (17 e 98 unidades, respectivamente) ao do presente trabalho que foi de 182.3 nódulos planta⁻¹ (Tabela 3). A capacidade de nodulação no BR17 Gurgueia foi também avaliada por Xavier et al. (2006), sendo superior a outros genótipos de feijão-caupi de origem brasileira, nigeriana e norte americana, com aproximadamente 160 nódulos, se aproximando dos valores encontrados nesse trabalho.

Tabela 2. Médias das análises de área foliar, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea e proteína da folha de quatro genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. em quatro estádios fenológicos, Seropédica-RJ, Brasil 2016.

| Genótipos | Área foliar (cm ²) | Parte Aérea | | Proteína (mg BSA/g MF) |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------------|----------|---------------------------|
| | | PF (g) | PS (g) | |
| CRESCIMENTO VEGETATIVO | | | | |
| BRS Novaera | 364,525 a | 14,152 a | 1,273 a | 2,232 b |
| BR17 Gurguéia | 263,621 ab | 8,740 b | 0,827 b | 2,326 b |
| Paulistinha | 254,671 b | 8,952 b | 0,870 b | 2,581 a |
| Espace10 | 289,431 ab | 10,218 ab | 0,947 ab | 2,336 ab |
| PRÉ-FLORESCIMENTO | | | | |
| BRS Novaera | 1040,613 a | 46,645 a | 8,517 a | 3,404 b |
| BR17 Gurguéia | 1099,918 a | 42,990 a | 6,991 a | 3,647 ab |
| Paulistinha | 1199,918 a | 44,752 a | 7,370 a | 3,519 ab |
| Espace10 | 1027,075 a | 42,133 a | 6,485 a | 3,667 a |
| FLORESCIMENTO PLENO | | | | |
| BRS Novaera | 1264,293 a | 47,436 b | 10,390 b | 2,997 b |
| BR17 Gurguéia | 1638,730 a | 75,014 a | 16,099 a | 3,846 a |
| Paulistinha | 1237,293 a | 53,284 b | 9,306 b | 2,994 b |
| Espace10 | 1413,526 a | 61,328 ab | 11,101 b | 2,963 b |
| ENCHIMENTO DE VAGEM | | | | |
| BRS Novaera | 1173,353 a | 84,048 a | 16,426 a | 2,486 ab |
| BR17 Gurguéia | 1286,953 a | 81,029 a | 16,729 a | 2,671 ab |
| Paulistinha | 1329,666 a | 68,158 a | 13,481 a | 2,400 b |
| Espace10 | 1297,583 a | 66,784 a | 12,684 a | 2,719 a |

*Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, dentro de cada fase, não diferem significativamente pelo teste LSD (alpha = 0,05).

Tabela 3. Médias das análises de número de nódulos N nódulos e peso seco (PS) de nódulo e raiz, de quatro genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. no estádio fenológico de pré-florescimento, Seropédica-RJ, Brasil 2016.

| Genótipos | N de nódulos | PRÉ-FLORESCIMENTO | |
|----------------------|--------------|-------------------|---------|
| | | PS (g) | |
| | | nódulo | raiz |
| BRS Novaera | 182,333 a | 0,462 a | 2,212 b |
| BR17 Gurguéia | 126,833 a | 0,358 a | 2,037 b |
| Paulistinha | 174,166 a | 0,487 a | 3,998 a |
| Espace10 | 165,667 a | 0,395 a | 2,410 b |

*Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste LSD (alpha = 0,05).

O florescimento pleno, quando 50% das plantas apresentam a primeira flor totalmente aberta, corresponde ao estádio em que ocorreram diferenças significativas para todas as variáveis analisadas, exceto para área foliar. Nesse estádio o BR17 Gurguéia apresentou os maiores valores para as características de peso fresco e seco de parte aérea e proteína de folha.

De acordo com Peoples et al. (1983) cada fruto absorve nitrogênio de todas as fontes disponíveis, mas o nitrogênio das folhas é preferencialmente distribuído para frutos próximos, assim como os frutos mais inferiores monopolizam o N exportado das raízes noduladas durante a frutificação tardia. O suprimento adequado de N através da FBN, em adição à fertilização nitrogenada deve aumentar o conteúdo de N na folha, fotossíntese e produção (Barros et al., 2016).

Os dados mostram uma tendência de aumento no teor de proteína na folha até o estádio de pré-florescimento, e a partir desse ponto ocorre uma redução desses valores (Tabela 2). Peoples et al. (1983) relatam que após o florescimento, o aporte de N para os frutos advém em 40 % da FBN e 60% por meio da mobilização do nitrogênio fixado em folhas, caule, raiz e nódulos antes da floração.

De acordo com Long et al. (2006) e Pimentel (2006), mais de 50% de N no teor de proteína solúvel em folhas é composto por ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) que é a enzima responsável pela fixação de CO₂ para a síntese de carboidratos, ou seja, existe uma relação direta entre a produção de fotoassimilados e o rendimento de biomassa. Dessa forma conhecer o conteúdo de N na folha pode ser uma característica útil com alta herdabilidade para melhorar o rendimento da cultura (Pimentel, 2006).

A redução no teor de proteína das folhas, observado neste trabalho, fica evidente principalmente para o cultivar BR17 Gurguéia, que apresenta conteúdo significativamente superior as demais no florescimento pleno, enquanto que, no enchimento de vagem, passa a se igualar as demais cultivares (Tabela 2). Essa redução pode estar associada a mobilização da proteína foliar em função do conteúdo de proteína solúvel nos grãos, uma vez que o cultivar foi o que também apresentou maior produção de grãos. O teor de proteína no grão foi inversamente representado pelo conteúdo de proteína na folha, por exemplo, o cultivar Espace 10 que se manteve com maior conteúdo de proteína na folha até o estádio de enchimento de vagem, foi também a que apresentou menor conteúdo de proteína no grão.

A produção média de grãos por planta foi de 5,8; 6,7; 7,8; 10,6; g planta⁻¹ dos genótipos Paulistinha, Espace10, Novaera e Gurguéia, respectivamente. Na literatura os valores médios de produtividade costumam variar conforme o manejo, época e também com a região de cultivo. Na avaliação e caracterização do cultivar Novaera, é possível encontrar valores de média de produtividade de 653 kg ha⁻¹ (Chagas Júnior et al., 2010) a 1.074,3 kg ha⁻¹ (Freire Filho et al.; 2008). As produtividades médias de 813 e 2.197 para BR17 Gurgueia, e de 1.070 e 1.180 do cultivar Paulistinha foram encontradas em estudos realizados por diferentes autores (Melo e Zilli, 2009; Rocha et al., 2011; Santos et al., 2014). O Espace 10, apresentou de acordo com Santos e Araújo (2000) produtividade variando de 1.048 a 2.694 kg ha⁻¹.

A remobilização de nutrientes tais como nitrogênio e fósforo de tecidos vegetativos para órgãos reprodutivos tem papel fundamental na produção de grãos em leguminosas (Ghanbari et al.; 2013). Entretanto apesar do acúmulo de proteína em sementes em desenvolvimento de culturas anuais estar associado a mobilização do nitrogênio de órgãos vegetativos em senescência (Frith e Dalling, 1980); para leguminosas noduladas, essa relação é considerada mais complexa, pela possibilidade da produção de sementes ser significativamente aumentada pela fixação do nitrogênio atmosférico durante a frutificação, provendo nitrogênio adicional ao disponível no solo e/ou tecidos senescentes (Peoples et al., 1983).

Partes da planta do feijão-caupi tais como folhas, vagens e sementes são usadas para consumo humano e são ricas em proteínas (Sebetha et al., 2015). As proteínas das leguminosas são principalmente proteínas de armazenamento pertencentes a diferentes grupos conforme suas

características de solubilidade (Klupšaitė e Juodeikienė, 2015). Dessa forma as proteínas podem ser solúveis em água (albuminas), sal (globulinas), álcool (prolaminas) e soluções alcalinas (glutelinas) (Osborne, 1924). As glutelinas podem ainda serem divididas em solúveis em meio ácido ou alcalino (Sukor et al., 2007).

As globulinas constituem a maior parte da proteína de semente, cerca de 72% da proteína extraível de sementes maduras de feijão-caupi (Murray et al. 1983); sendo assim, também responsáveis pelo seu valor nutricional (Bressani, 1985). Freitas et al. (2004) encontraram que globulinas e albuminas (compondo 51% e 45% do total de proteínas de sementes, respectivamente) constituem uma clara maioria das proteínas de semente. O conteúdo das frações, apresentado na Tabela 4, não está em total acordo com Freitas et al. (2004) uma vez que apesar das globulinas representarem cerca de 84% do total das proteínas de armazenamento, ou seja a maior parte, as albuminas correspondem apenas a 2%. Na literatura é comum encontrar valores do teor de albumina variando desde 2,5 a 28% (Chan e Phillips, 1994). O reduzido conteúdo de albumina encontrado nesse trabalho em relação a literatura, possivelmente se relaciona com o método de extração utilizado. Embora por definição albuminas sejam proteínas solúveis em água (Osborn, 1924), a maioria dos trabalhos com feijão-caupi (Chan e Phillips, 1994; Fotso et al., 1994; Odeigah e Osanyinpeju, 1996; Vasconcelos et al., 2010), utilizam uma solução salina para extração de uma mistura de globulinas e albuminas que são posteriormente separadas por diálise. Assim, o método utilizado nesse trabalho determina como globulina toda a proteína extraída com NaCl 0,5 M e como albumina a fração extraída numa etapa seguinte com água destilada, o que em termos comparativos pode ocasionar uma superestimação de globulinas e uma subestimação de albuminas.

Os genótipos estudados não apresentaram diferenças significativas para teor de globulina. Enquanto que para albumina dois genótipos foram contrastantes, o Paulistinha com 0,55 e o Espace 10 com 0,66% (Tabela 4). As globulinas são nutricionalmente deficientes em cisteína e metionina já as albuminas são ricas em lisina, cisteína e metionina (Clemente et al., 1998; Wang et al., 2003). Dessa forma as albuminas são frequentemente consideradas como sendo de composição de aminoácidos mais favorável do que as globulinas (Wang et al., 2003). Assim, genótipos com maior teor de albumina podem ser interessantes para programas de melhoramento que visem aumentar a qualidade nutricional do grão.

Os genótipos apresentam também diferenças significativas para prolamina, glutelina básica e ácida. Os maiores valores são encontrados para BRS Novaera com valores de 0,5 (prolamina), 4,31 (glutelina básica) e 0,86 % (glutelina ácida). Esses valores se assemelham aos relatados por Gupta et al. (2010) que teve para prolamina teores entre 0,64 e 1,4 e para glutelina, sem diferenciar glutelina básica de glutelina ácida, 4,27 e 4,01 g por 100g farinha. De acordo com Gupta et al. (2010), o conteúdo de prolamina apresenta correlação negativa com teor de lisina, ou seja, genótipos com elevado teor de prolamidas tendem a ter baixo teor de lisina.

Os perfis proteicos de proteínas de armazenamento podem funcionar como uma impressão bioquímica geral para cultivares de feijão-caupi (Mahfouz, 2015) e são utilizados com sucesso em estudos da biossistêmica de plantas cultivadas (Kalloo et al., 2001). Nesse sentido, um dos principais objetivos dos estudos de SDS-eletroforese de sementes é a possibilidade de correlacionar a presença e a ausência de bandas de polipeptídios específicos com características específicas ou gerais da cultura (Odeigah e Osanyinpeju, 1996).

Tabela 4. Frações das proteínas de reserva nos grãos de quatro genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Os valores estão expressos em porcentagem da farinha seca.

| Genótipos | Frações Proteicas (g . 100g farinha ⁻¹) | | | | | | Proteína Solúvel Total |
|----------------------|--|-----------|-----------|---------------------|--------------------|----|---------------------------|
| | Albumina | Globulina | Prolamina | Glutelina básica | Glutelina ácida | | |
| BRS Novaera | 0,61 | ab | 24,61 | a | 0,5 | a | 4,31 a 0,86 a 30,88 ab |
| BR17 Gurguéia | 0,63 | ab | 26,77 | a | 0,35 | c | 3,10 c 0,77 b 31,62 ab |
| Paulistinha | 0,55 | b | 27,88 | a | 0,43 | b | 3,68 b 0,84 a 33,38 a |
| Espace 10 | 0,65 | a | 25,21 | a | 0,37 | bc | 1,83 d 0,57 c 28,63 b |

*Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste LSD (alpha = 0,05).

Com relação aos géis de eletroforese para as cinco frações solúveis de proteínas (albumina, globulina, prolamina, glutelina ácida e glutelina básica) os perfis dos quatro genótipos foram semelhantes em todas as frações, o que significa que a maioria das bandas foram comuns aos diferentes genótipos indicando uma relação próxima entre eles (Figura 2). Os pesos moleculares das bandas de proteínas apresentadas nos géis de SDS-PAGE variaram entre 10 e 90 kDa, para albuminas, entre 15 e 100 kDa para globulinas; prolaminas entre 15 e 90 kDa e para glutelinas ácida e básica entre 15 e 100 kDa (Figura 2). Gupta et al. (2014) encontraram para os genótipos avaliados em seu trabalho uma dispersão de bandas que variou entre 15,85 a 147,9; 10 a 125,9; 7,94 a 56,23 e 10 a 79,43 kDa para albumina, globulinas, prolaminas e glutelinas, respectivamente.

Dois genótipos se destacaram por apresentar divergências quanto ao perfil eletroforético. O genótipo Novaera apresentou diferenças quanto ao seu padrão de bandas para albumina, globulina e glutelina básica; seja pela presença de uma banda extra (entre 10 e 15 kDa para albumina) ou pela menor intensidade da banda entre 20 e 25 kDa da fração globulina ou ainda pela supressão/ ou não detecção de uma banda em glutelina ácida (40 kDa) (Figura 2). Já no genótipo Gurguéia, as bandas entre 50 e 70 kDa da fração prolamina, estavam ausentes ou não foram detectadas (Figura 2).

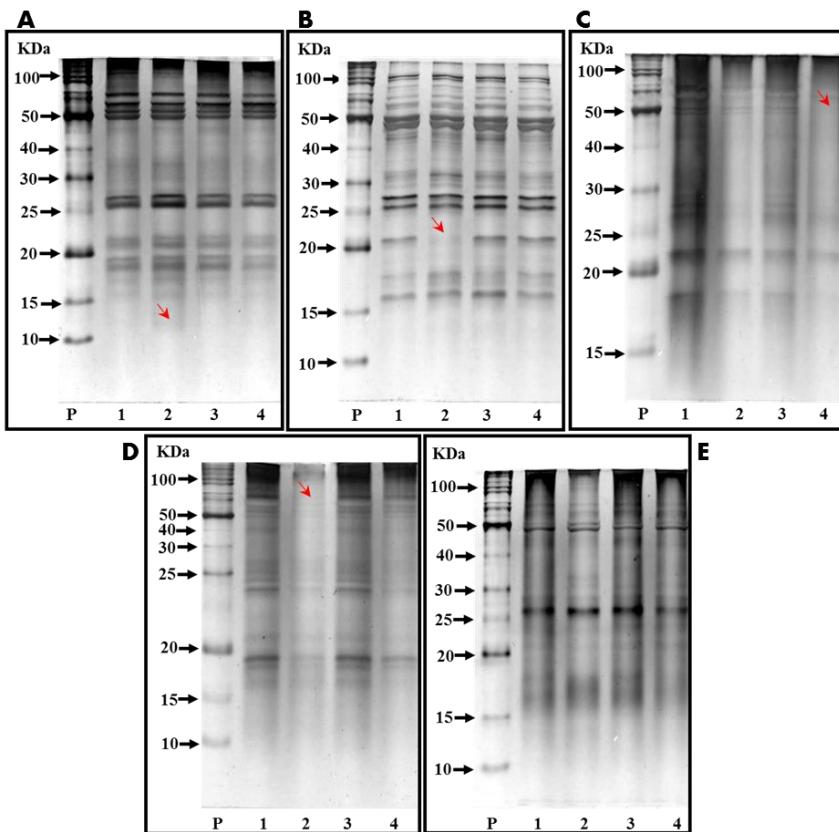


Figura 2. Perfil eletroforético SDS-1D de: A- Albuminas; B- Globulinas; C- Prolaminas; D- Glutelina ácida; E- Glutelina básica. A canaleta “P” é a do padrão de massas moleculares; 1- Paulistinha; 2-Novaera; 3 -Espace 10; 4 - Gurguéia. As setas indicam posições de bandas: em A - presença de uma banda extra, em B- menor intensidade da banda, em C e D – supressão de bandas.

O perfil eletroforético dos quatro genótipos foi também examinado em estudo anterior pelos autores, onde, diferentemente deste que teve as plantas crescidas em vaso em casa de vegetação, os grãos analisados naquele momento foram oriundos de cultivo a campo. A comparação dos dados obtidos nestes dois momentos, mostraram diferenças marcantes no perfil eletroforético das cultivares para todas as frações. Entretanto como a sementes utilizadas no cultivo em vaso foram originadas do cultivo a campo, ou seja, a mesma origem genética, presume-se que as variações ocorridas se deram em função do ambiente, época de plantio ou ainda devido ao tempo de armazenamento.

Gupta et al. (2010) encontraram uma correlação negativa entre globulinas e aminoácidos sulfurados e entre prolaminas e lisina, ou seja, genótipos que apresentaram maior conteúdo de globulina foram também os que apresentaram menor teor de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), enquanto que, os com maior conteúdo de prolaminas corresponderam também aos com menor conteúdo de lisina. Com base na análise de aminoácidos solúveis (Tabela 5), a relação descrita por Gupta et al. (2010) não se aplica a este trabalho, ou seja, não houve correlação entre os níveis de prolamina e lisina, pois tanto o genótipo com mais prolamina (Paulistinha) quanto o com menos prolamina (Gurguéia), não apresentaram diferença significativa para teores de lisina.

Tabela 5. Teor de aminoácidos solúveis nos grãos de quatro genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Os dados estão expressos em μg de aminoácido por 100 g de farinha seca.

| Aminoácidos solúveis nos grãos | Genótipos | | | |
|--------------------------------------|-------------|---------------|-------------|-----------|
| | BRS Novaera | BR17 Gurguéia | Paulistinha | Espace 10 |
| | essenciais | | | |
| HIS | 0,422 a | 0,729 ab | 0,995 b | 0,813 ab |
| THR | 0,118 a | 0,107 a | 0,105 a | 0,105 a |
| LYS | 0,048 b | 0,045 ab | 0,047 b | 0,041 a |
| MET | 0,029 b | 0,025 ab | 0,024 a | 0,023 a |
| PHE | 0,440 a | 0,386 a | 0,495 a | 0,916 b |
| ILE | 0,053 a | 0,053 a | 0,061 a | 0,058 a |
| LEU | 0,047 a | 0,037 a | 0,044 a | 0,047 a |
| não-essenciais | | | | |
| ARG | 0,599 ab | 0,308 a | 1,768 c | 0,804 b |
| ASP | 0,245 a | 0,410 a | 0,468 a | 0,366 a |
| SER | 0,092 a | 0,089 a | 0,198 a | 0,151 a |
| ALA | 0,206 a | 0,192 a | 0,199 a | 0,147 a |
| CYS | 0,020 b | 0,013 a | 0,014 a | 0,014 a |
| TYR | 0,206 b | 0,083 a | 0,217 bc | 0,256 c |
| VAL | 0,127 a | 0,131 a | 0,182 a | 0,182 a |
| PRO | 0,238 a | 0,228 a | 0,308 a | 0,171 a |
| GLY | 0,107 a | 0,084 a | 0,102 a | 0,083 a |
| GLU | 177,133 a | 200,575 a | 259,698 a | 231,655 a |

*Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste LSD (alpha = 0,05).

O cultivar Novaera foi o que apresentou os maiores teores de aminoácidos sulfurados (metionina, cisteína), $0,049 \mu\text{g aa. } 100\text{g farinha}^{-1}$ no total, que são coincidentes com o maior teor de albumina encontrado. Uma vez que na literatura as albuminas são descritas como uma fração rica em lisina, cisteína e metionina (Clemente et al., 1998), pode-se por associação dizer que quem tem mais albumina, possivelmente terá mais lisina, cisteína e metionina. Entretanto, Chan e Phillips (1994), estudando o cultivar Califórnia para teores de aminoácidos incorporados, não encontraram diferenças significativas para teor de metionina entre as diferentes frações proteicas.

Os teores de ácido glutâmico superaram em muito os demais aminoácidos, não havendo, entretanto, significância entre os cultivares. Na literatura, o teor de ácido glutâmico, é sempre reportado como superior ao conteúdo dos demais aminoácidos, representando entre 17 e 19% do total de aminoácidos incorporados (Chan e Phillips, 1994; Iqbal et al., 2005). Entretanto a ordem de grandeza encontrada neste trabalho, é muito superior; com ácido glutâmico representando em média 98% do total de aa solúveis extraídos. Os teores de apenas sete aminoácidos (histidina, arginina, cisteína, lisina, tirosina, metionina e fenilalanina) apresentaram diferenças significativas entre os genótipos.

4. CONCLUSÕES

Os cultivares BRS Novaera e BR17 Gurguéia se destacaram por apresentarem maior produção de grãos associada a elevado teor de proteína solúvel no grão. Além disso a BRS Novaera apresentou maiores teores de aminoácido sulfurados (metionina e cisteína) solúveis, não diferindo quanto ao teor de metionina do cultivar BR17 Gurguéia, e ambas apresentaram polimorfismo de bandas, com destaque para o cultivar Novaera que apresenta uma banda extra para albuminas. As informações de polimorfismo são importantes em estudos de seleção assistida ou sobre diferenças alergênicas, podendo assim, serem melhores investigados em trabalhos futuros.

5. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, R. A.; ARANA, J. L.; ARRUDA, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant Ltr*19 with opaque-2 maize mutant. *Plant Science*, v.70, p.81-90, 1990.

BARROS, R. L. N. et al. Growth and yield of common bean as affected by seed inoculation with rhizobium and nitrogen fertilization. *Experimental Agriculture*, p. 1-15, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRESSANI, R. Nutritive value of cowpea. In Cowpea Research, Production, and Utilization; Singh, R. S., Rachie, K. O., Eds.; John Wiley e Sons Ltd.: New York, 1985.

BURSTIN, J. et al. 20 Improving Protein Content and Nutrition Quality. *Biology and breeding of food legumes*, p. 314, 2011.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 4, 2010.

CHAN, Chi-Wah; PHILLIPS, R. Dixon. Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 42, n. 9, p. 1857-1860, 1994.

CLEMENTE, A. et al. Effect of cooking on protein quality of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. *Food Chemistry*, v. 62, n. 1, p. 1-6, 1998.

CHUNG, J. et al. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. *Crop science*, v. 43, n. 3, p. 1053-1067, 2003.

ELHARDALLOU, S. B. et al. Amino Acid Composition of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Flour and Its Protein Isolates. *Food and Nutrition Sciences*, v. 6, n. 9, p. 790, 2015.

FATOKUN, C. A. et al. Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. In: Proceedings of the World Cowpea Conference III held at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria. 2000. p. 4-8.

FOTSO, M. et al. Molecular heterogeneity of cowpea (*Vigna unguiculata* Fabaceae) seed storage proteins. *Plant Systematics and Evolution*, v. 191, n. 1-2, p. 39-56, 1994.

FRITH, G. J. T.; DALLINO, M. J. The role of peptide hydrolases in leaf senescence. In: Senescence in plants. Ed. K. V. Thimann. CRC Press, Inc., Boca Raton. p. 117-30, 1980.

FREIRE FILHO, F. R. et al. BRS Novaera: cultivar de feijão-caupi de porte semi-ereto. Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 2008.

FREIRE FILHO, F. R. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. 1. ed. Teresina, PI: Embrapa, p. 84, 2011.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, A. B. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 6, p.1682-1687, 2004.

GHANBARI, A. A. et al. Nitrogen changes in the leaves and accumulation of some minerals in the seeds of red, white and chitti beans (*Phaseolus vulgaris*) under water deficit conditions. *Australian Journal of Crop Science*, v. 7, n. 5, p. 706, 2013.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, v. 131, n. 3, p. 872-877, 2003.

GUPTA, P. et al. Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2010.

INAIZUMI, H. Adoption and impact of dry-season dual-purpose cowpea in the semiarid zone of Nigeria. IITA, 1999.

IQBAL, A. et al. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, v. 97, n. 2, p. 331-335, 2006.

JUNG, M. S. et al. Herdabilidade e ganho genético em caracteres do fruto do maracujazeiro-doce. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, p. 209-214, 2008.

KALLOO, G. et al. Seed Protein Electrophoresis for Varietal Identification of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.e]. *Seed Research-New Delhi-*, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2001.

KLUPŠAITĖ, D.; JUODEIKIENĖ, G. Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review. *Chemical Technology*, v. 66, n. 1, p. 5-12, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LONG, Stephen P. et al. Can improvement in photosynthesis increase crop yields?. *Plant, Cell & Environment*, v. 29, n. 3, p. 315-330, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAHFOUZ, H. M. Assessment of genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata*) using sds-page, random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Egyptian Journal of Genetics And Cytology*, v. 44, n. 1, 2015.

MALIK, U.; KARMAKAR, A.; BARIK, A. Variation in fatty acids throughout the developmental stages of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. leaves. *Botany Letters*, v. 163, n. 4, p. 461-468, 2016.

MARTINS, L. M. V. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and fertility of soils*, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.

MELO, S. R.; ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 9, p. 1177-1183, 2009.

MORRISSEY, James H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical biochemistry*, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.

MURRAY, D. R. et al. Electrophoretic Studies of the Seed Proteins of Cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v. 109, n. 4, p. 363-370, 1983.

ODEIGAH, P. G. C.; OSANYINPEJU, A. O. Seed protein electrophoretic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata*) germplasm from IITA gene bank. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 43, n. 6, p. 485-491, 1996.

OKONYA, J. S.; MAASS, B. L. Protein and iron composition of cowpea leaves: an evaluation of six cowpea varieties grown in Eastern Africa. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, v. 14, n. 5, p. 2129-2140, 2014.

OSBORNE, T. B. The vegetable proteins (2nd edn.). Longmans Green, London. 1924.

PEOPLES, M. B., PATE, J. S., and ATKINS, C. A. Mobilization of nitrogen in fruiting plants of a cultivar of cowpea. *Journal of Experimental Botany*, v. 34, p. 563-78, 1983.

POTTORFF, M. et al. Leaf morphology in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]: QTL analysis, physical mapping and identifying a candidate gene using synteny with model legume species. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 234, 2012.

PIMENTEL, C. Efficiency of nutrient use by crops for low input agro-environments. *Focus on plant agriculture*, v. 1, p. 277-328, 2006.

SUKOR, R. et al. Characterisation of the ability of globulins from legume seeds to produce cocoa specific aroma. *ASEAN Food Journal*, v. 14, n. 2, p. 103-114, 2007.

RAGAB, D. M.; BABIKER, E. E., ELTINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, v. 84, p. 207-212, 2004.

RAVELOMBOLA, W. S. et al. Evaluation of Total Seed Protein Content in Eleven Arkansas Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Lines. *American Journal of Plant Sciences*, v. 7, n. 15, p. 2288, 2016.

ROCHA, M. de M. et al. Seleção de genótipos de feijão-caupi tipo comercial Canapu no semiárido piauiense. 2011.

SANTOS, Ca. A. F.; ARAUJO, F. P de. Produtividade e morfologia de genótipos de caupi em diferentes densidades populacionais nos sistemas irrigado e de sequeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 10, p. 1977-1984, 2000.

SANTOS, C. A. F. et al. Genetic analysis of total seed protein content in two cowpea crosses. *Crop Science*, v. 52, n. 6, p. 2501-2506, 2012.

SANTOS, M. A. et al. Mapping of QTLs associated with biological nitrogen fixation traits in soybean. *Hereditas*, v. 150, n. 2-3, p. 17-25, 2013.

SANTOS, J. A. da S. et al. Desempenho agronômico e divergência genética entre genótipos de feijão-caupi cultivados no ecótono Cerrado/Pantanal. *Bragantia*, v. 73, n. 4, p. 377-382, 2014.

SEBETHA, E. T.; MODI, A. T.; OWOEYE, L. G. Cowpea crude protein as affected by cropping system, site and nitrogen fertilization. *Journal of Agricultural Science*, v. 7, n. 1, p. 224, 2015.

SINGH, B. B. et al. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. *Field Crops Research*, v. 84, n. 1, p. 169-177, 2003.

SINGH, R. J.; CHUNG, G. H.; NELSON, R. L. Landmark research in legumes. *Genome*, v. 50, n. 6, p. 525-537, 2007.

VASCONCELOS, I. M. et al. Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. *Journal of food composition and analysis*, v. 23, n. 1, p. 54-60, 2010.

WANG, Trevor L. et al. Can we improve the nutritional quality of legume seeds?. *Plant Physiology*, v. 131, n. 3, p. 886-891, 2003.

XAVIER, Gustavo Ribeiro et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Revista Caatinga*, v. 19, n. 1, 2006.

ANEXOS

Anexo A - Otimização do método de extração de proteínas de reserva e determinação de proteínas

Anexo B - Protocolo para análise de Fitato

Anexo C - Protocolo para análise de minerais

Anexo D - Anova

Anexo A – Otimização do método de extração de proteínas de reserva e determinação de proteínas

Para viabilizar a comparação de 18 genótipos de feijão-caupi; eliminando-se a diálise e reduzindo drasticamente os volumes dos solventes utilizados, optou-se por otimizar o método descrito em Vasconcelos et al. (2000) com base nos trabalhos de Ragab et al. (2004) (não realiza a etapa da diálise na extração) e Landry et al. (2000) (utiliza apenas 2 mL de solução de extração em quanto que para feijão-caupi é comum o uso de grandes volumes de soluções de extração, da ordem de 50 mL).

Assim o método proposto nesse trabalho difere dos relatados na literatura por reunir duas características importantes, que é a eliminação da diálise e o uso de pequenos volumes de soluções de extração.

Preparo do Material Vegetal

Os grãos de feijão-caupi foram liofilizados durante 48h, sendo posteriormente triturados e peneirados para se obter uma farinha homogênea.

Extração das proteínas de reserva

Amostra de 100 mg foram pesadas, colocadas em eppendorf de 2 mL e tratadas com 1 mL de hexano, à temperatura ambiente durante 15 minutos, com leves agitações, centrifugadas a 12000 RCF por 5 min à 25 °C e deixadas para secar *overnight* ao ar livre. O hexano é utilizado para solubilizar os lipídeos presentes na farinha e impedir que estes pudessem interferir na extração proteica.

O processo de extração é sequencial, desta forma foi utilizado o precipitado da extração anterior como *pellet* para a extração seguinte.

1. Extração de globulinas

Foi adicionado à farinha seca (no dia seguinte a etapa com hexano) 1 mL de uma solução 0,5 M de NaCl. As amostras foram agitadas por 30 minutos a 4°C, sendo posteriormente centrifugadas a 12000 RCF por 5 min à 4°C. Este processo foi repetido três vezes e os sobrenadantes obtidos após cada centrifugação foram misturados e armazenados.

2. Extração de albuminas

A fração albumina foi extraída submetendo o *pellet* anterior a uma nova extração com 1 mL de água destilada e agitadas por 30 minutos à 4°C sendo posteriormente centrifugadas a 12000 RCF por 5 min à 4°C. O procedimento foi repetido três vezes. O sobrenadante obtido após a primeira centrifugação foi descartado por apresentar conteúdo de albuminas próximo a zero, provavelmente devido a presença de resíduos da solução salina na amostra o que impede a solubilização destas albuminas. Os sobrenadantes da segunda e da terceira centrifugação foram misturados e armazenados.

3. Extração de prolaminas

As prolaminas foram obtidas adicionando-se 0,5 mL de etanol 70%, agitadas por 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 RCF por 5 min à 25°C O sobrenadante obtido foi armazenado.

4. Extração glutelinas

As glutelinas foram obtidas em duas frações. As glutelinas ácidas, extraídas em 1 mL de solução 0,1 M HCl enquanto as glutelinas básicas foram extraídas em 1 mL de solução 0,1 M NaOH. As amostras foram agitadas por 30 min à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido por centrifugação foi armazenado.

Determinação de proteína

A concentração de proteína nas frações em todas as amostras foi quantificada utilizando-se Kits da Bio-Rad. Assim as análises das frações, albumina, globulina, prolamina e glutelina ácida seguiram o método de Bradford (1976) e utilizaram o Kit Protein Assay da Bio-Rad, enquanto que para glutelina básica o método utilizado se assemelha ao desenvolvido por Lowry (1951) utilizando o Kit DC Protein Assay. Como padrão foi utilizado o soro albumina bovina (BSA). Os valores foram determinados em relação à curva padrão de concentrações conhecidas por meio de regressão linear.

Considerações sobre o método de extração de proteínas de armazenamento

Características que podem ser importantes para este e outros trabalhos de pesquisa:

- I. Simplicidade, uma vez que usa eppendorf de 2 mL e não usa a diálise, o que significa uma economia de tempo para extração das frações albumina e globulina.
- II. Incorporação da etapa de extração da glutelina ácida, propostas por Vasconcelos et al. (2010), demonstrando maior capacidade de extração de proteínas do que o método tradicional apenas com uma solução alcalina.
- III. Alteração na metodologia para quantificação da fração básica das glutelinas, onde o método modificado de Lowry (Kit Bio-Rad DC Protein Assay) foi adotado, por apresentar maior estabilidade da amostra. Além disso, de acordo com manual do kit da Bio-Rad Protein Assay, a solução de NaOH é conhecida por interferir no método com Bradford.
- IV. Possui grande capacidade de extração equiparando-se ao método de Kjeldhal.
- V. Apresenta a desvantagem de superestimar o conteúdo de globulinas e subestimar as albuminas.

Anexo B – Protocolo para análise de Fitato

O método utilizado foi descrito em Latta e Eskin (1980), o qual se baseia na formação de um composto fero-ácido-sulfossalissílico de coloração azul escuro denominado reagente de Wade. Na presença de fitato o ferro é deslocado, reduzindo a intensidade da coloração.

Procedimento:

1. Pesou-se 250 mg da farinha liofilizada em tubos falco de 15mL
2. Adiciona-se 10mL de HCl 2,4% e deixa sob agitação durante 3h, para que ocorra a extração e solubilização do fitato. (fator diluição 10X – 25mg de tecido/ 1mL de HCl)
3. Centrifuga-se a 6000 rpm, 20 min à 20 °C
4. Retira-se o sobrenadante e guarda-se no freezer uma parte

Tratamento da Resina

- a. Colocar em água miliQ por 1h e mexer 2-3 vezes, até precipitar a resina.
- b. Retirar a água cuidadosamente para não retirar a resina junto. Acrescentar NaCl 0,7M por 1h e mexer por 2-3 vezes até precipitar a resina.
- c. Retirar o NaCl cuidadosamente e colocar água miliQ até o uso.

Obs.: a quantidade de água colocada deve ser 2X a quantia em gramas de resina (1g resina/2mL água).

5. Adiciona-se 8mL de água miliQ + aproximadamente 3mL de resina tratada + 2mL da amostra (sobrenadante passo 4) – (não tem fator diluição, pois o fitato vai se prender a resina – 50 mg tecido/2mL resina).
6. Agitar durante 1h
7. Centrifugar a 6000 rpm, 10 min à 20 °C
8. Descartar sobrenadante
9. Acrescentar a resina 8mL de NaCl 0,07M, para que se possa retirar impurezas como proteínas e fósforo inorgânico. (não tem fator de diluição pos o fitato encontra-se ligado à resina).
10. Agitar 10 min
11. Centrifugar a 6000 rpm, 10 min à 20 °C
12. Descartar sobrenadante
13. Acrescentar a resina 8mL de NaCl 0,7M para eluir o fitato da resina e deixa-lo em solução. (diluição 50mg de tecido em 8mL de NaCl 0,7M = 6,25mg/mL)
14. Agitar durante 1h
15. Centrifugar a 3000 rpm, 10 min à 20 °C
16. Usar o sobrenadante para fazer a quantificação, alíquota de 3mL.

Quantificação

- a. 3mL amostra (sobrenadante) + 2mL de reagente Wade.
- b. Centrifugar a 6000 rpm, 10 min à 20 °C
- c. Pipeta-se 1mL da amostra para quantificação em espectrofotômetro a 500nm de comprimento de onda

A resina pode ser reutilizada por até 4X

Reagente de Wade:

0,3 g de ácido sulfossalícílico
0,03 g de cloreto de férrico
Completar para um volume final de 100 mL

Preparo Curva Padrão

| | |
|---|--|
| Estoque I (solução 300 ppm) Pesar 0,03 g de fitato de sódio para 100 mL de água destilada | Estoque II (solução 210 ppm) 35 mL do estoque I e completar para 50 mL |
|---|--|

Pontos da Curva:

| Padrão (mL) | água (mL) | mg/L (ppm) |
|-------------|-----------|------------|
| 0 | 3,0 | 0 |
| 0,5 | 2,5 | 35 |
| 1,0 | 2,0 | 70 |
| 1,5 | 1,5 | 105 |
| 2,0 | 1,0 | 140 |
| 2,5 | 0,5 | 175 |
| 3,0 | 0 | 210 |

Anexo C- Protocolo para análise de minerais do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Ciência do Solo (Esalq)

Digestão nitro-perclórica

Pesa-se 0,5g matéria seca (farinha liofilizada de feijão-caupi) passando para tubo de digestão em bloco de 40 provas, com 6mL de solução de ácido nítrico mais perclórico na relação (4 + 0,5) com temperatura inicial de 50 °C, passar para 75 °C e 100 °C por mais 15 minutos, 120 °C por 30 minutos e 160 °C até saída total da matéria orgânica (fumus avermelhados) passando logo após a 180 °C para a homogeneização dos volumes das amostras (se necessário) e a seguir passar para 210 °C até a saída de fumos brancos ou redução do volume final (sem que ocorra a secagem total da amostra). Colocar 50mL de H₂O deionizada para o tubo e homogeneizar até dissolver todos os minerais.

Quantificação dos minerais

a) Fósforo (P)

Colocar 1 mL do extrato em tubo de ensaio de 15mL, adicionando-se 6mL de solução vanado-molibídica. Determinação colorimétrica.

Solução vanado-molibídica – Seguir (Avaliação do Estado Nutricional das Plantas), conforme mudanças a seguir:

- Pesar 125g de molibdato de amônio e passar para aproximadamente 800mL de H₂O deionizada aquecida a 80°C, agitando até dissolução, retirar da chapa e esfriar.
- Pesar 6,25g de metavanato de amônio para 200mL H₂O aquecida (80°C), dissolver, retirar e esfriar.
- Juntar a essa solução, 700mL de NHO₃ concentrada e esfriar.
- Juntar as duas soluções frias em balão de 2 litros e completar o volume com água deionizada ou destilada.
- Juntar 250 mL dessa solução a 2750mL de água deionizada ou destilada.

Padrões:

Os padrões são feitos a partir de uma solução 1000ppm de P, com ácido (10mL de solução nitro-perclórica 4+0,5), sendo suas concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100ppm de P partindo de solução 1000ppm. Retirar 1mL de cada padrão mais 6mL de solução vanado-molibídica e efetuar a curva (reta padrão) com leitura do branco, sendo feita em 1mL de H₂O mais 6mL de solução colorida.

b) Enxofre (S)

Coloca-se 10 mL de extrato em tubo de ensaio de 30mL e adiciona-se 1mL de solução de HCl 6N com 20ppm de S, mais 0,5g de BaCl₂. Determinação colorimétrica (Turbidimétrica).

Solução estoque de S a 1000 ppm: em balão volumétrico de 1000mL adicionar 5,434g de K₂SO₄ a seco por 2 horas a \pm 110°C, juntar 10mL de solução nitroperclórica. Completar o volume com água deionizada.

Soluções de Trabalho:

| Volume de Padrão (mL) | Balão volumétrico Diluição | Concentração Final (ppm) | Aliquota (mL) |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|---------------|
| 1 | 200 | 5 | 10 |
| 3 | 200 | 15 | 10 |
| 5 | 200 | 25 | 10 |
| 8 | 200 | 40 | 10 |
| 10 | 200 | 50 | 10 |

c) Potássio (K), cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

1mL extrato é adicionado à 19mL de óxido de lantânia a 0,1% em tubo de ensaio de 30mL. Determinação na absorção atômica.

d) Alumínio (Al)

10mL do extrato, juntar 10mL da solução 0,1N de HCl, 5mL da solução 0,1N de CaCl₂, 2mL de solução a 1% de ácido ascórbico e 15mL de reativo composto (partes iguais, de solução de alumínion a 0,1%, gelatina a 1% solução tampão pH = 5,30).

Obs.: Os reagentes estão em "Avaliação do estado nutricional princípios e aplicações".

Al (simplificado)

1mL do extrato, juntam 5mL de solução contendo: 1mL de CaCl₂ 0,1N; 1mL de solução a 1% de ácido ascórbico; 1mL de solução aluminon a 0,1%; 1mL gelatina a 1% e 1mL de solução tampão pH = 5,3.

e) Cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e sódio (Na)

Leituras diretas no extrato nitroperclórico.

Anexo D - Anova

TABELAS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAPÍTULO 1

FRAÇÕES SOLÚVEIS

| Frações solúveis | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|------------------|-------------|--------|--------|-------|
| globulina | 24,324 | 1,480 | 0,1378 | 14,74 |
| albumina | 0,484 | 2,197 | 0,0148 | 33,41 |
| prolamina | 0,1424167 | 1,440 | 0,1546 | 28,29 |
| glutelina ácida | 1,0237444 | 7,460 | 0 | 25,14 |
| glutelina básica | 2,76597 | 24,384 | 0 | 15,25 |

MINERAIS E FITATO

| Minerais e fitato | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|-------------------|-----------------|---------------|----------|-------------|
| P | 5,043081 | 4,151 | 0,002 | 4,21 |
| K | 12,155000 | 5,459 | 0,0004 | 4,69 |
| Ca | 0,408333 | 2,616 | 0,025 | 11,9 |
| Mg | 1,080556 | 2,535 | 0,0289 | 7,07 |
| S | 1,344369 | 2,277 | 0,0461 | 13,38 |
| Cu | 5,097222 | 0,864 | 0,6168 | 19,69 |
| Fe | 63,041667 | 0,511 | 0,9134 | 9,84 |
| Mn | 11,833333 | 10,172 | 0 | 7,45 |
| Zn | 53,152778 | 10,498 | 0 | 3,46 |
| FITATO | 9,698208 | 13,978 | 0 | 9,68 |

CAPÍTULO 2

CRESCIMENTO VEGETATIVO

| | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|-----------------|-------------|-------|--------|-------|
| área foliar | 293,0625 | 2,43 | 0,1402 | 18,91 |
| PF parte aérea | 10,515625 | 3,922 | 0,0542 | 20,88 |
| PS parte aérea | 0,97975 | 3,538 | 0,0679 | 18,98 |
| proteína foliar | | | | |

PRÉ-FLORESCIMENTO

| | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|------------------------|--------------------|-----------|-----------------|------------|
| área foliar | 1067,057 | 0,129 | 0,9405 | 17,54 |
| PF parte aérea | 44,1304167 | 0,18 | 0,9069 | 18,49 |
| PS parte aérea | 7,3412917 | 0,888 | 0,4874 | 21,62 |
| proteína foliar | | | | |
| N de nódulos | 162,25 | 0,94 | 0,4652 | 27,05 |
| PS nódulos | 0,4258583 | 0,66 | 0,5992 | 29,69 |
| PS raiz | 2,6646667 | 4,086 | 0,0494 | 29,01 |

FLORESCIMENTO PLENO

| | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|-----------------------|--------------------|-----------|-----------------|------------|
| área foliar | 1396,805 | 1,785 | 0,2277 | 16,44 |
| PF parte aérea | 59,2658333 | 4,499 | 0,0395 | 16,46 |
| PS parte aérea | 11,7243333 | 5,194 | 0,0278 | 19,5 |

ENCHIMENTO DE VAGEM

| | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|------------------------|--------------------|-----------|-----------------|------------|
| área foliar | 1271,889167 | 0,062 | 0,9786 | 37,33 |
| PF parte aérea | 74,4219167 | 0,791 | 0,532 | 21,06 |
| PS parte aérea | 14,6385833 | 1,551 | 0,2749 | 17,83 |
| proteína foliar | | | | |

FRAÇÕES SOLÚVEIS E PROTEÍNA SOLÚVEL

| | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|-------------------------------|--------------------|-----------|-----------------|------------|
| albumina | 0,61125 | 2,045 | 0,1613 | 10,25 |
| globulina | 26,115 | 1,232 | 0,3408 | 10,25 |
| prolamina | 0,411875 | 12,445 | 0,0005 | 9,27 |
| glutelina básica | 3,230625 | 89,302 | 0 | 6,92 |
| glutelina ácida | 0,760625 | 32,97 | 0 | 6 |
| proteína solúvel total | 31,129375 | 2,108 | 0,1527 | 8,7 |

AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS

| | Média Geral | Fc | Pr>Fc | CV% |
|------------|--------------------|-----------|-----------------|------------|
| HIS | 0,7401013 | 3,321 | 0,1382 | 25,06 |
| ARG | 0,869715 | 44,194 | 0,0016 | 15,47 |
| ASP | 0,3721738 | 1,593 | 0,3238 | 28,44 |
| THR | 0,10851 | 0,107 | 0,9518 | 24,28 |
| CYS | 0,0154625 | 32,071 | 0,0029 | 5,11 |
| LYS | 0,0454288 | 0,868 | 0,5274 | 10,31 |
| TYR | 0,19044 | 41,425 | 0,0018 | 8,64 |
| MET | 0,02498 | 2,07 | 0,2468 | 9,71 |
| PHE | 0,5595825 | 17,346 | 0,0093 | 14,68 |
| VAL | 0,1553513 | 2,111 | 0,2416 | 19,27 |
| ILE | 0,0560888 | 0,289 | 0,8323 | 17,65 |
| LEU | 0,0438525 | 0,765 | 0,5701 | 17,54 |
| SER | 0,1325575 | 2,705 | 0,1803 | 33,7 |
| ALA | 0,1860288 | 0,599 | 0,6487 | 25,91 |
| PRO | 0,2359663 | 1,847 | 0,279 | 24,6 |
| GLY | 0,093935 | 0,567 | 0,6657 | 24,56 |
| GLU | 217,265335 | 0,737 | 0,5826 | 27,33 |