



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



THÁBATA LAÍS DE ARAÚJO BARBOSA NASCIMENTO

**PREPARO DE AMOSTRAS APLICADO A ANÁLISE DE PROTEÍNAS  
EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI (*VIGNA UNGUICULATA* (L.)  
WALP.)**

TERESINA – PI  
2016

THÁBATA LAÍS DE ARAÚJO BARBOSA NASCIMENTO

**PREPARO DE AMOSTRAS APLICADO A ANÁLISE DE PROTEÍNAS  
EM SEMENTES DE FEIJAO-CAUPI (*VIGNA UNGUICULATA* (L.)  
WALP.)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa

TERESINA – PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do CCN

N244p Nascimento, Thábata Laís de Araújo Barbosa.  
Preparo de amostras aplicado à análise de proteínas  
em sementes de feijão-caupi ( *Vigna unguiculata* (L.) Walp.)  
/ Thábata Laís de Araújo Barbosa Nascimento. – Teresina,  
2016.  
45f. il. color

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,  
Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em  
Química, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa.

1. Feijão-caupi – Análise. 2. Feijão-caupi – Composição  
Química - Proteínas. I. Título

CDD 635.659 2


THÁBATA LAÍS DE ARAÚJO BARBOSA NASCIMENTO

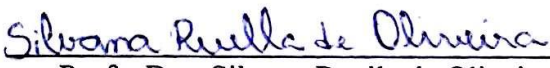
**PREPARO DE AMOSTRAS APLICADO A ANÁLISE DE PROTEÍNAS  
EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI (*VIGNA UNGUICULATA* (L.)  
WALP.)**

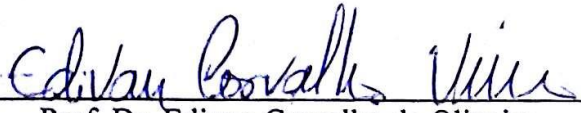
Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em 20/01/2017.

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa  
Universidade Federal do Piauí  
Orientador e Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Silvana Ruella de Oliveira  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edivan Carvalho de Oliveira  
Universidade Federal do Piauí  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que mesmo nos momentos em que eu não acreditava, não me abandonou.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, carinho, apoio e confiança durante toda a minha vida. Obrigado por acreditarem e mim.

Ao meu noivo Haroldo Alencar, pelo amor, carinho, apoio e compreensão, nos momentos mais difíceis você esteve ao meu lado, quando nem eu acreditava em mim mesma você não desistiu. Obrigada por caminhar comigo nestes anos.

Ao professor Herbert de Sousa Barbosa, pela orientação, oportunidade e compreensão. Agradeço pela confiança, paciência e auxílio. Obrigada pelo apoio e incentivo, pelos sábios ensinamentos e, principalmente, pelo exemplo como pessoa e pesquisador.

Aos professores que fizeram parte da minha caminhada, seja inspirando como orientadores do saber, seja dando preciosos conselhos. Agradeço, especialmente, à professora Rosa Lina Gomes do Nascimento Pereira da Silva, por sua amizade e por ceder gentilmente sua sala para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

Ao professor Cícero Lopes Alves Júnior, pela co-orientação neste projeto. Obrigada pela paciência, disponibilidade e atenção.

Ao professor Samuel Anderson Alves de Sousa, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do GRIAPA, pelo apoio e amizade. Agradeço, principalmente, ao Tiago, Marluce e Bárbara pela ajuda nos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, pelo suporte físico e intelectual, que contribuíram de modo direto para a formação do meu caráter e postura profissional.

A CAPES pela bolsa de estudos que propiciou a minha dedicação exclusiva a este projeto.

A todos que contribuíram para a realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

NASCIMENTO, T. L. A. B (2017). Preparo de amostras aplicado a análise de proteínas em sementes de feijão-caupi (*vigna unguiculata* (L.) Walp.). Teresina. 42 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Piauí.

Neste estudo, 20 protocolos diferentes para extração de proteínas de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in natura foram avaliados, utilizando quatro parâmetros como critérios de comparação: procedimento analítico, tempo, temperatura e tipo de solvente. Nesse sentido, um total de 20 protocolos foram definidos. Depois de cada protocolo de extração, o teor de proteínas totais foi determinado e os resultados estão inseridos num intervalo de  $8,75 \pm 0,75 \text{ mg.g}^{-1}$  a  $86,6 \pm 3,98 \text{ mg.g}^{-1}$ . Observou-se que o tipo do procedimento analítico, o tipo de solvente e a temperatura de extração foram significativos para a eficiência da extração. Para o estudo comparativo dos perfis cromatográficos, os protocolos P4, P8, P10, P16, P18 e P20 foram selecionados, pois demonstraram maiores eficiências na etapa de extração. A análise dos perfis cromatográficos, de acordo com os pesos moleculares das proteínas extraídas, demonstrou que o protocolo P18, onde utilizou-se água e radiação micro-ondas a uma temperatura de  $50^\circ \text{C}$ , apresentou a maior eficiência para extração das proteínas do feijão-caupi. Este resultado foi corroborado, estatisticamente, pela Análise de Componentes Principais (PCA), onde o protocolo P18 demonstrou diferenças em relação aos demais métodos.

**Palavras-chave:** Feijão-caupi, Proteínas, Preparo de Amostras, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, T. L. A. B (2017). Sample preparation applied to protein analysis on cowpea seeds (*vigna unguiculata* (L.) Walp.). Teresina. 42 p. Thesis (Master) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Piauí.

In this study 20 different protocols for protein extraction of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seeds *in natura* were evaluated taking into account four parameters: analytical procedure, time, temperature and type of solvent. In this sense, a total of 20 protocols were defined. After each extraction procedure, the total protein content was determined and the results are in the range of  $8.75 \pm 0.75 \text{ mg.g}^{-1}$  to  $86.6 \pm 3.95 \text{ mg.g}^{-1}$ . It was observed that the type of analytical procedure, the type of solvent and extraction temperature were significant for the extraction efficiency. For the comparative study of the chromatographic profiles, P4, P8, P10, P16, P18 and P20 protocols were selected since they demonstrated higher efficiencies in the extraction stage. The analysis of the chromatographic profiles according to the molecular weights of the extracted proteins demonstrated that the, P18 protocol, which uses water and microwave radiation at a temperature of  $50^\circ \text{C}$ , showed the highest efficiency for extracting proteins cowpea seeds. This result was corroborated, statistically, by Principal Component Analysis (PCA), in which the P18 protocol showed differences in relation to the other methods.

**Keywords:** Cowpea seeds, proteins, Sample preparation, High Performance Liquid Chromatography.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	<i>Cromatografia por Afinidade, do inglês, Affinity Chromatography</i>
CLAE	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico, do inglês, deoxyribonucleic acid</i>
DTT	<i>1,4-ditiotreitol</i>
EDTA	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês, Ethylene Diaminetetraacetic Acid</i>
EMBRAPA	<i>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</i>
IEX	<i>Cromatografia de Troca Iônica, do inglês, Ion Exchange Chromatography</i>
IPG	<i>Gradiente de pH imobilizado, do inglês, immobilized pH gradient</i>
MAPA	<i>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</i>
PCA	<i>Análise de Componentes Principais, do inglês, Principal Component Analysis</i>
PMSF	<i>Fenilmetanossulfonilo, do inglês, Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
SEC HPLC	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão por Tamanho, do inglês, Size Exclusion High Performace Liquid Chromatography</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucleico, do inglês, ribonucleic acid</i>
RPC	<i>Cromatografia de Fase Reversa, do inglês, Reversed-phase Chromatography</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sódio, do inglês, Sodium dodecyl sulfate</i>
TRIS	<i>Tris(hidroximetil)aminometano</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Feijão-caupi.....	17
Figura 2. Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos protocolos P4 e P8.....	33
Figura 3. Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos protocolos P10 e P16.....	34
Figura 4. Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos protocolos P18 e P20.....	35
Figura 5. Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos diferentes protocolos: P4, P8, P10, P16, P18 e P20.....	36
Figura 6. Modelo PCA para os perfis cromatográficos dos extratos dos protocolos P4, P8, P10, P16, P18 e P20. Gráfico de escores, PC1 <i>versus</i> PC2.....	37
Figura 7. Modelo PCA para os perfis cromatográficos dos extratos dos protocolos P4, P8, P10, P16, P18 e P20. Gráfico de pesos, PC1 <i>versus</i> PC2.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área, produção e produtividade de feijão-caupi por estado brasileiro.....	14
Tabela 2. Composição química do feijão-caupi verde e maduro in natura.....	16
Tabela 3. Protocolos de extração de proteínas.....	26
Tabela 4. Características da coluna, condições cromatográficas e de detecção empregadas na identificação de metalobiomoléculas nos extratos obtidos a partir sementes de feijão caupi.....	28
Tabela 5. Concentração de proteínas totais $\pm$ desvios padrão das médias ( $\text{mg g}^{-1}$ , $n=3$ ) em feijão - caupi obtidas pelos diferentes protocolos de extração e determinada pelo método de Bradford.....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
3.1 Feijão-Caupi.....	14
3.2 Proteômica.....	18
3.3 Preparo de amostras para análise de proteínas.....	19
3.4 HPLC: utilização do HPLC para análise de proteínas.....	20
3.5 Ferramentas Quimiométricas.....	23
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
4.1 Reagentes e Amostras.....	25
4.2 Protocolos de extração de proteínas.....	25
4.3 Teor de proteínas totais.....	26
4.3.1 Separação e análise das proteínas empregando cromatografia de exclusão por tamanho.....	27
4.3.2 Análise por componentes principais .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
5.1 Concentração de proteínas totais.....	29
5.2 Avaliação dos extratos proteicos empregando HPLC-UV.....	31
5.3 Análise por componentes principais .....	37
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo biomoléculas mostram-se como atividades complexas, exigindo considerável cuidado do analista durante a análise, principalmente devido às características destas biomoléculas no ambiente biológico em estudo [1]. Diferentes áreas da ciência da vida mostram que estudos de biomoléculas são de extrema importância para a compreensão de muitos sistemas biológicos, como aqueles estudos desenvolvidos por diferentes “ômicas”, tais como a genômica, proteômica, metabolômica, metalômica, dentre outras [2,3]. Em cada uma destas áreas, a primeira etapa do processo analítico corresponde ao preparo de amostras e, devido às características estruturais destas biomoléculas, esta etapa deve ser feita com cuidado de modo que os resultados obtidos sejam adequados ao propósito do estudo, gerando conclusões apropriadas. Sendo assim, ressalta-se a importância da escolha da metodologia de preparo de amostras para análise de proteínas (objeto de estudo deste trabalho) levando em consideração o compromisso entre eficiência e manutenção da integridade do analito. O preparo de amostras visando análise de proteínas consiste de inúmeras etapas, como a ruptura celular que comumente pode ser realizada por maceração manual [3-5] ou empregando estratégias alternativas, tais como radiação micro-ondas ou energia ultrassônica [6-8].

Atualmente, a proteômica de plantas tem tido enorme destaque dentre as ciências da vida, sendo o objetivo de inúmeros estudos presentes na literatura cuja realização tem uma participação decisiva das técnicas analíticas corroborando com a elucidação dos diversos aspectos de processos metabólicos importantes dos sistemas biológicos, dentre outros [9,10]. Neste contexto, as proteínas destacam-se por participar de vários dos eventos presentes nos sistemas biológicos, onde a análise de suas expressões (sobre-expressões ou sub-expressões) tem sido o foco principal de inúmeros estudos em proteômica de plantas, pois fornecem valiosas informações sobre o status do sistema biológico. [11-13]. Sendo assim, a escolha do procedimento de preparo de amostras torna-se uma etapa fundamental do processo analítico de modo que a otimização adequada desta etapa é decisiva para que os resultados obtidos ilustrem a variação biológica e não a experimental.

Em virtude da grande importância que as proteínas exercem na alimentação diária da população humana, uma variedade de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) foi selecionada como amostra para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente por suas características nutricionais e por ser uma importante fonte de proteínas para o consumo humano. O feijão-caupi é uma das culturas mais importantes nas regiões Norte e Nordeste do

nosso país e encontra-se em expansão na região centro-oeste do Brasil. É um componente cada vez mais presente nos arranjos produtivos familiares e, nos últimos anos, vem sendo incorporada a sistemas de produção de pequenas, médias e grandes empresas. Além de ser uma excelente fonte de proteínas (23-25%, em média), o feijão-caupi contém todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas, minerais, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) [14,15]. Sendo assim, estudos proteômicos podem ser uma importante ferramenta para melhorar o teor de proteínas deste grão, bem como avaliar a influência de diferentes condições fisiológicas como o estresse oxidativo [16] e estresse hídrico [17] no perfil proteômico das sementes.

Neste trabalho, foi realizada a otimização de um procedimento de extração de proteínas de sementes de feijão-caupi. Vinte procedimentos de extração de proteínas foram avaliados usando como estratégias a maceração manual bem como o emprego das energias micro-ondas e ultrassônica, tendo como meio extratores a água ou solução tampão. Em todos os protocolos, as concentrações de proteínas totais foram avaliadas e, os extratos obtidos por meio dos métodos de extração mais eficientes foram analisados empregando a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPLC-SEC-UV) para observar possíveis mudanças nos perfis proteômicos a partir da comparação dos cromatogramas obtidos para os diferentes extratos.

Os perfis cromatográficos obtidos foram comparados de modo a identificarmos as similaridades e diferenças entre os protocolos avaliados. Para isso, foi utilizada a ferramenta estatística de Análise de Componentes Principais (PCA). O propósito desse tipo análise é determinar os componentes principais com o objetivo de visualizar a estrutura de dados, encontrar similaridade entre amostras, detectar amostra anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a importância de diferentes procedimentos de preparo de amostras para análise de proteínas em sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar o teor de proteínas totais, para cada protocolo avaliado, usando o método espectrofotométrico de Bradford;
- Comparar o teor de proteínas totais, para cada protocolo avaliado, de modo a avaliar a influência dos parâmetros avaliados na eficiência de extração das proteínas nas sementes de feijão-caupi;
- Obter os perfis proteômicos, em relação aos protocolos com melhores resultados na avaliação de concentração de proteínas totais, usando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão de Tamanho para separação das proteínas;
- Avaliar os diferentes perfis proteômicos obtidos nos cromatogramas, de modo a caracterizar a distribuição quanto à abundância das proteínas presentes;
- Comparar os perfis cromatográficos obtidos usando a ferramenta estatística Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Feijão-Caupi

No Brasil são cultivadas diversas espécies de feijão, entretanto, para efeito de regulamento técnico, somente as espécies *Phaseolus vulgaris* (L.) e *Vigna unguiculata* (L.) Walp., feijão-comum e feijão-caupi (Figura 1), respectivamente, são consideradas como feijão pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA [18].

Estudiosos dizem que o feijão-caupi é uma cultura de origem africana, sendo introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos portugueses no estado da Bahia. Atualmente a produção de feijão-caupi concentra - se nas regiões nordeste e norte, sendo cultivado predominantemente no sertão semiárido da região nordeste e em pequenas áreas da Amazônia, em expansão para a região centro – oeste, principalmente para o estado do Mato Grosso. Seu cultivo representa 95% a 100% do total de áreas plantadas com feijão nos estados da Amazônia, Maranhão, Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. No nordeste, a produção e a produtividade são de 429.375 t e 303,5 kg/ha, respectivamente. Os maiores produtores são os estados do Ceará (159.471 t), Piauí (58.786 t), Bahia (50.249 t) e Maranhão (35.213 t), os quais também apresentam as maiores áreas plantadas (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 1993-2001). Com relação aos aspectos socioeconômicos, a cultura do feijão-caupi é responsável pela geração de 1.451.578 empregos/ano no Brasil, com o valor de produção estimado em US\$ 249.142.582,00/ano [19].

Dados atuais trazem que a região nordeste continua sendo a maior produtora de feijão-caupi no país, a Embrapa Arroz e Feijão tem obtido estimativas, não oficiais, sobre a produção anual de feijão-caupi no Brasil e nos estados produtores. De acordo com estas estimativas, a produção em 2014 foi de 482.665 toneladas colhidas em 1.202.491 hectares (Tabela 1). Importante ressaltar que em 2011 o Brasil produziu cerca de 800 mil toneladas colhidas em 1,7 milhões de hectares, esse recorde ocorreu devido às boas condições pluviométricas, especialmente no Nordeste do Brasil [20].

**Tabela 1.** Área, produção e produtividade de feijão-caupi por estado brasileiro.

Estados	Área (ha)	Produção (ton)	Produtividade (kg/ha)
MT	116.000	127.000	1.095
CE	398.002	107.291	270
PI	214.224	55.278	258
PE	180.338	52.406	291
MA	98.152	50.314	513
PA	39.169	26.442	675
BA	46.200	20.890	452
PB	64.551	17.604	273
RN	25.420	10.407	409
AM	5.295	5.560	1050
AL	8.960	5.364	599
RR	3.000	2.001	667
AP	1.180	1.108	939
SE	2.000	1.000	500
Total	1.202.491	482.665	7.991

Fonte: Embrapa Meio Norte, 2016.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), comumente chamado de feijão de corda ou o feijão macassar, é um alimento básico da população de baixa renda do nordeste brasileiro [14]. É comercializado basicamente em feiras e, muitas vezes, dentro de sua vagem. Como qualquer alimento, a sua vida útil é curta e formas alternativas de conservação são necessárias para o aumento de sua vida de prateleira [19].

É uma excelente fonte de proteína (23% - 25% em média) e apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média), como apresentado na Tabela 2. Apresenta ciclo curto, baixa exigência hídrica e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade e, por meio de simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* e, a habilidade para fixar nitrogênio no ar. O caupi, com uma média de 25% de proteína, possui um perfil de aminoácidos típicos de leguminosas, ricas em lisina e com baixas concentrações de aminoácidos sulfurados [19]. Uma vez que as proteínas de cereais são deficientes em certos aminoácidos essenciais, o feijão caupi é um cereal considerado rico em lisina.



**Tabela 2.** Composição química do feijão-caupi verde e maduro in natura.

Constituintes ensaiados	Feijão-caupi verde (g/100g)	Feijão-caupi maduro (g/100g)
Umidade	66,35 ± 0,80	11,08 ± 0,98
Proteínas	9,65 ± 0,09	22,13 ± 0,80
Lipídios	0,83 ± 0,00	1,87 ± 0,00
Cinzas	1,63 ± 0,10	3,56 ± 0,35
Carboidratos totais	21,54 ± 1,02	61,36 ± 0,90
Fibra alimentar total	7,54 ± 0,70	18,00 ± 0,36
Fibra solúvel	1,85 ± 0,50	1,61 ± 0,30
Fibra insolúvel	5,69 ± 0,04	16,37 ± 0,08
Amido total	7,62 ± 0,80	41,36 ± 0,60
Amido resistente (2)	1,85 ± 0,07	12,07 ± 0,85
Amilose	1,95 ± 0,03	14,62 ± 0,01
Amilopectina	4,72 ± 0,00	25,35 ± 0,00
Açúcares totais	6,38 ± 0,60	2,00 ± 0,05
Valor calórico total (kcal)	102,07 ± 2,20	278,79 ± 2,75

Fonte: Salgado *et al.* (2005).

Pelo seu valor nutritivo, o feijão-caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes para o consumo humano, in natura, na forma de conserva ou desidratado. Além disso, o feijão-caupi também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo. Na região nordeste, a produção tradicionalmente concentra-se nas áreas semiáridas, onde outras culturas leguminosas anuais, em razão da irregularidade das chuvas e das altas temperaturas, não se desenvolvem satisfatoriamente. A produção do feijão-caupi nas regiões norte e nordeste é feita por empresários e agricultores familiares que ainda utilizam práticas tradicionais.

Quanto a sua estrutura, as sementes de feijão caupi, possuem como material de reserva proteínas e carboidratos, principalmente o amido. O amido é uma das mais importantes formas de reserva de carbono nas plantas, no que se refere a sua quantidade, a universalidade de sua distribuição e a importância comercial. As sementes de *V. unguiculata* apresenta forma reniforme orbicular, de superfície lisa brilhante [19].

Uma das espécies cultivadas na Embrapa Meio-Norte na cidade de Teresina – PI, é a cultivar BRS Guariba que apresenta crescimento indeterminado, tem ramos relativamente

curtos e apresenta resistência ao acamamento, essa característica a torna adaptada à colheita mecânica com o uso de dessecamento. A cultivar é recomendada para cultivo de sequeiro nos estados do Piauí e Maranhão, onde apresentou uma média de produtividade de 1.475Kg/ha e de 1.508 Kg/ha, respectivamente. Apresenta ciclo de 65 a 70 dias. É resistente a mosaico transmitido por pulgão e o mosaico dourado, moderadamente resistente ao Oídio e a mancha café, e moderadamente tolerante a seca e a altas temperaturas [19].

**Figura 1.** *Feijão-caupi.*



Fonte: Google Imagens.

### 3.2 Proteômica

A proteômica é estudo global de proteínas o ou organismo incluindo não só a identificação e quantificação, mas também a determinação da sua localização, modificações, interações e funções. O proteoma reflete o estado de funcionamento do sistema em condições fisiológicas específicas, ou seja, a expressão funcional do genoma. Estratégias de preparo de amostras para análise de proteínas devem ser cuidadosamente selecionadas, principalmente devido à natureza complexa do proteoma celular, com o objetivo de reduzir a heterogeneidade da amostra a nível molecular bem como, obter de resultados significativos e fidedignos [21-22].

O estudo da proteômica pode levar a três vertentes básicas, com implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia: permite a descoberta de vias metabólicas nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular e na bioquímica; permite viabilizar a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos; e permite também a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico [23].

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. As proteínas também ocorrem em grande variedade, milhares de diferentes tipos, desde peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros com pesos moleculares na faixa de milhões, podem ser encontradas em uma única célula. As proteínas também exibem uma grande diversidade de funções biológicas, sendo os produtos finais mais importantes das vias de informação. Em um sentido, eles são os instrumentos moleculares por meio das quais a informação genética é expressa [24].

Análise ao nível de proteínas é necessária, pois o estudo dos genes através do sequenciamento dos genes, ou seja, o estudo genômica, não pode adequadamente prever a estrutura dinâmica das proteínas, uma vez que é ao nível das proteínas que muitos dos processos de uma célula ocorrem, onde processos iniciais de doenças acontecem e onde muitas drogas medicinais atuam. Sendo assim, a proteômica é o método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas em uma célula, tecido ou organismo. Proteômica pode ser vista como uma metodologia de seleção da biologia molecular, a qual tem como objetivo documentar a distribuição geral de proteínas da célula, identificar e caracterizar proteínas individuais de interesse e principalmente elucidar as suas

associações e funções. As proteínas de uma forma geral controlam a vida e a saúde, ou seja, é preciso entender as proteínas e como elas operam celularmente para assim entender como regular os mecanismos de uma doença para um posterior tratamento, por exemplo. [25].

### **3.3 Preparo de amostras para análise de proteínas**

O estudo proteômico geralmente consiste em três etapas principais: preparo de amostras, a separação e a identificação das proteínas. O preparo da amostra é fundamental para uma boa análise proteômica sendo essencial para a obtenção de bons resultados. Diversas são as opções de preparo de amostras, dentre elas está à ruptura celular que pode ser realizada por lise osmótica, ciclos de congelamento e descongelamento da amostra para romper as membranas celulares e extrair proteínas presente na amostra, sonicação, lise enzimática, quebra mecânica (com uso de nitrogênio líquido), alta pressão, etc.

Um processo ideal de preparo de amostras deve resultar em uma completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas das amostras. Para a caracterização de proteínas específicas em mistura complexa, as proteínas de interesse devem estar completamente solubilizadas sob as condições nas quais se trabalhará [4]. A etapa de solubilização é importante, uma vez que a não solubilização adequada dificulta a etapa de separação da proteína, as mesmas devem ser solubilizadas de modo a promover a quebra de interações entre agregados proteicos, tais como a ligação de hidrogênio/dissulfeto, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e iônicas.

A solubilização pode ocorrer com a utilização de agentes caotrópicos como a ureia, que é eficiente na quebra de ligações de hidrogênio e a tiouréia que é eficiente na quebra de interações hidrofóbica; outra forma é utilizando detergentes não-iônicos (NP – 40, Triton X – 10, dodecyl – maltoside) ou zwitteriônicos (CHAPS) ou utilizando agentes redutores (DTT e  $\beta$  - mercaptoethanol), por sonicação ou utilizando - se agentes anfólitos carregadores. Diferentes tratamentos e condições são requeridos para diferentes tipos de amostras de proteínas. Algumas proteínas são naturalmente encontradas em complexos de membranas, ácidos nucleicos, algumas formas de proteínas formam vários agregados não específicos, e algumas proteínas precipitam quando removidas de seu meio natural.

A efetividade da solubilização depende da escolha do método de ruptura celular, do método de concentração e solubilização da proteína, da escolha do detergente e da composição da solução da amostra. Se essas etapas não forem otimizadas para uma amostra

particular, as separações podem ser incompletas ou distorcidas e informações podem ser perdidas [26-27].

Deve ocorrer a remoção e/ou inativação de compostos interferentes. Diversos são os compostos conhecidos como interferentes, e estes devem ser removidos. Alguns deles são: inibidores de protease (leupeptina, E-64, EDTA, ETC); os sais interferem diretamente no pH, produzindo calor e acumulando nas duas extremidades da fita IPG – Gradiente de pH imobilizado, sendo que sua remoção pode ser feita por diálise, gel filtração ou precipitação; os lipídios interferem profundamente na eletroforese, e sua remoção se dá através do uso de detergentes em concentrações acima de 2% ou através de precipitação; os ácidos nucleicos que aumentam a viscosidade da amostra e podem causar manchas de fundo de gel, são removidas por precipitação de proteínas, por sonicação e pela extração do DNA/RNA; os polissacarídeos removem por procedimentos enzimáticos ou precipitação; material insolúvel são removidos por centrifugação [28].

### **3.4 HPLC: utilização do HPLC para análise de proteínas**

Nos dias atuais a cromatografia é bem diversificada e oferece possibilidades para o isolamento e a obtenção de preparações proteicas com significativas homogeneidades. Dentre os métodos de cromatografia líquida mais usados rotineiramente, pode – se citar: a cromatografia de exclusão por tamanho e peneiração molecular (SEC), a cromatografia de troca iônica (IEX), cromatografia de fase reversa (RPC), a cromatografia por afinidade (AC) entre outras.

Para Silva Júnior [29] o processo cromatográfico é baseado na distribuição diferenciada de solutos na fase móvel e uma fase estacionária, onde a fase móvel é o líquido que percorre a coluna cromatográfica e que se denomina eluente e a fase estacionária é a fase resina ou gel que preenche a coluna que esta suspensa no meio líquido. A resolução de uma coluna cromatográfica, ou a capacidade de distinguir as várias frações relativas a uma amostra sob análise, depende de uma série de fatores, desde o tipo de eluente, o tipo de gel ou resina, a vazão do eluente pela coluna, a temperatura e outros. No processo cromatográfico os componentes de uma mistura separados em forma de bandas na coluna, são observados, após detecção adequada, como picos no sistema de registro. Existem vários tipos de detectores (UV, amperométrico e outros) sendo que os mesmos são localizados logo após o final da

coluna cromatográfica e estão ligados a registradores. A resolução de uma amostra por coluna é uma função de três fatores: seletividade ( $\alpha$ ), fator de capacidade ( $k$ ) e número de pratos teóricos ( $n$ ). A resolução  $R$ , de uma coluna cromatográfica, pode ser calculada pela equação:

Nos dias atuais existem três maneiras de se trabalhar a cromatografia líquida com proteínas, essa distinção diz respeito não só a velocidade do eluente pela coluna cromatográfica, como também no tamanho da partícula na fase estacionária da coluna. Na cromatografia *clássica* a velocidade do eluente pela coluna é lenta e, por via de regra, o processo cromatográfico é demorado. Velocidades da ordem de 10 a 40 cm/h são, comumente, observados neste tipo de cromatografia, enquanto as partículas de fase estacionária apresentam um tamanho de ordem de algumas dezenas de micrômetro. Para se alcançar resoluções satisfatórias são necessárias colunas com alturas significativas. No segundo caso o processo cromatográfico pode ser acelerado em função da maior resistência da partícula (5 – 15 micrometros), quando comparado ao tamanho da partícula usada no processo anterior. Esta é a cromatografia *acelerada* (HPLC) e velocidades de ordem de 50 – 300 cm/h são usados. O terceiro processo é cromatografia *superacelerada*, cuja característica que distingue das cromatografias anteriores, é o fato que a resolução cromatográfica independe do eluente pela coluna. Velocidades de ordem de 300 cm/h - 4.000 cm/h podem ser usadas em colunas cromatográficas de dimensões relativas reduzidas [29].

A etapa de separação das proteínas constitui-se como uma das mais difíceis na análise proteômica. A escolha desse método exige conhecimento prévio de todo o protocolo utilizado, de modo que possíveis problemas apresentados durante a separação possam ser identificados, avaliados e corrigidos. Como técnica de separação das proteínas presentes nas sementes do feijão-caupi, foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que, atualmente, é uma das técnicas de separação mais aplicadas em estudos proteômicos devido a sua robustez, reprodutividade, grande variedade de modalidades de separação (ex. fase reversa, troca iônica, exclusão por tamanho, afinidades, interação hidrofóbica, dentre outras) além de permitir sua hifenação com outras técnicas analíticas (ex. Espectrometria de massas) o que a torna uma excelente ferramenta de separação de proteínas antes da análise no espectrômetro de massas [30-31].

Segundo Tonhi *et al.* [32], a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados, para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com

destaque para indústria farmacêutica, bem como suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como da medicina. Alguns problemas envolvidos em análises por HPLC estão relacionados à adsorção de proteínas na fase estacionária, resultando em perda substancial de eficiência da coluna, curto tempo de vida da coluna cromatográfica e um aumento da pressão de retorno. Neste sentido, etapas prévias de preparo de amostras em análises cromatográficas são indispensáveis para reduzir a complexidade da amostra [33-34].

Segundo Collins [35] a CLAE é importante, pois consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Ela utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais espacialmente preparados e uma fase móvel eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.

Na CLAE emprega-se uma coluna fechada, reaproveitável; portanto, até centenas de separações individuais podem ser realizadas com a mesma coluna. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência a vazão da fase móvel. Por essa razão, faz-se necessário empregar uma bomba de alta pressão que faz com que a fase móvel migre a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada facilmente, resultando em operações mais reprodutíveis que tornam as análises executadas pela CLAE mais precisas. Uma injeção precisa da amostra é obtida rapidamente, usando-se uma válvula de injeção. Vários tipos de detectores, que são colocados na saída da coluna, proporcionam um registro contínuo da composição do efluente, o que permite obter um cromatograma, que se pode utilizar para identificar e/ou quantificar os componentes da amostra. A detecção contínua e com grande repetitividade na CLAE proporciona as análises quantitativas um alto nível de exatidão e precisão, que podem ser superior a  $\pm 0,5\%$  [35].

Uma das técnicas de cromatografia é a de exclusão por tamanho (SEC – UV), que se baseia no tamanho das moléculas da amostra. As moléculas de tamanho muito grande não conseguem penetrar nos poros da fase estacionária, sendo excluídas e arrastadas pela fase móvel através da coluna em um tempo curto. As moléculas da amostra que são suficientemente pequenas penetram em todos os poros da fase estacionária, sofrendo permeação total, e como a fase móvel está parada nos poros, a difusão é o único caminho pelo qual as moléculas saem dos poros. Sendo assim, elas se movem mais lentamente que as moléculas excluídas ou com penetração parcial nos poros, sendo as últimas a chegarem no

detector. As moléculas médias tem penetração parcial nos poros, utilizam apenas parte do volume do poro disponível e conseguem ser separadas [35].

### 3.5 Ferramentas Quimiométricas

Faz-se necessário utilizar técnicas de tratamentos de dados que ajudem na identificação de informações relevantes da problemática em estudo. Um desses tratamentos de dados é a Quimiometria, que é uma ferramenta estatística e matemática para o planejamento e otimização das condições experimentais, e para a extração de informações químicas relevantes de dados químicos multivariados [36-37]. Diversos softwares quimiométricos e ambientes computacionais estão disponíveis no mercado, dentre elas pode-se destacar o Matlab, Minitab, Pirouette, SIMCA - P + e o Unscrambler, além de ambientes baseados em software livre como o Octave e R [38].

Para que o método seja confiável, é necessário garantir que o sinal analítico seja característico somente da espécie de interesse (analito), ou seja, que ele seja seletivo. Isto requer uma etapa prévia de preparo de amostra, o que no caso da cromatografia é obtido pela escolha adequada das condições do método (coluna cromatográfica, fase móvel, temperaturas etc.), tendo como consequência o aumento nos custos e no tempo do experimento [37].

Na indústria química em geral, a associação de ferramentas quimiométricas com técnicas instrumentais (espectroscopia NIR, UV/Vis, Vis/NIS, GC, HPLC, fluorescência de Raio-X, DSC) são empregadas no desenvolvimento de métodos analíticos para controle de qualidade, qualificação de matéria prima e controle de processos. No Brasil, as principais áreas que empregam esses métodos são as indústrias de alimento, papel e celulose, petróleo, e mais recentemente a indústria farmacêutica, mas o seu potencial se estende a todas as áreas da química [37].

O emprego de uma metodologia quimiométrica pode auxiliar demasiadamente na quantificação e identificação do teor total de proteínas, como por exemplo. Dentre as diversas subáreas da Quimiometria pode-se destacar o planejamento fatorial, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. Com esta última, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade (concentração, por exemplo) [38].



Dentre as vertentes da Quimiometria, existe a Análise exploratória de dados químicos com a utilização de PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), que é uma técnica multivariada de modelagem da estrutura de covariância, que transforma linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionados entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original [39]. O propósito desse tipo de análise é determinar as componentes principais de forma a explicar da melhor forma possível da variação total dos dados com o menor número possível de componentes e é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura de dados, encontrar similaridade entre amostras, detectar amostra anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados [38].

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e amostras

Os reagentes utilizados para extração, quantificação e análise por HPLC tais como Tris-base, cloreto de potássio (KCl), ditioneitol (DTT), fenilmetanossulfonilo (PMSF) e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) usando um sistema de purificação Milli-Q.

A amostra de semente de feijão-caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) utilizado neste estudo foi uma cultivar Guariba, o qual foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Maurisrael de Moura Rocha, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio Norte).

### 4.2 Protocolos de extração de proteínas

Para o procedimento de extração das proteínas, 0,6 g de sementes de feijão-caupi foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas por 10 minutos. Ao material granulado obtido foram adicionados 10 mL de éter de petróleo e agitado manualmente por 10 minutos para remoção do óleo presente na semente. Este procedimento foi realizado três vezes e um volume apropriado do solvente de extração foi adicionado.

Para a extração foram avaliados quatro parâmetros: solvente de extração (água deionizada e tampão Tris-HCl, contendo KCl, DTT, PSMF e SDS); tempo de extração (10 min e 20 min); temperatura (25 °C e 50 °C) e procedimento analítico (maceração manual, radiação ultrassônica e radiação micro-ondas), resultando em um total de 20 protocolos de extração (Tabela 3). Para cada procedimento de extração foram utilizados 10 mL de solvente (água ou solução-tampão). A solução tampão consiste dos seguintes componentes: 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8; 1,5 mmol L<sup>-1</sup> KCl; 10 mmol L<sup>-1</sup> ditioneitol (DTT); 1,0 mmol L<sup>-1</sup> flúor fenilmetanossulfonilo (PMSF) e 0,1% m/v dodecil sulfato de sódio (SDS). Os aparelhos de banho de ultrassom (USC-1600, Unique) e forno micro-ondas (Anton Paar MW3000) foram utilizados para os protocolos P9 a P16 e P17 a P20, respectivamente. No processo de radiação por micro-ondas a temperatura não foi variada, uma vez que o objetivo deste procedimento foi verificar a influência do aquecimento gerado pela radiação micro-ondas na extração das proteínas.

Levando em consideração a classificação proposta por Osborne [40], as proteínas extraídas dos protocolos P1 a P4, P9 a P12, P17 e P18 podem ser correlacionadas com as proteínas da classe das albuminas (solúveis em água). Todos os outros protocolos usados podem ser correlacionados com a classe das globulinas (solúveis em sais).

Após cada procedimento, o material insolúvel remanescente foi removido por centrifugação (Bio-Spin-R, BioAgency, São Paulo, Brasil) durante 10 minutos a 10000 x g (4 °C). As soluções sobrenadantes foram armazenadas em tubos Falcon® e congeladas a -18 °C.

**Tabela 3.** *Protocolos de extração de proteínas.*

<b>Protocolo</b>	<b>Descrição</b>
P1	Água deionizada, 25 °C, 10 min, maceração manual
P2	Água deionizada, 25 °C, 20 min, maceração manual
P3	Água deionizada, 50 °C, 10 min, maceração manual
P4	Água deionizada, 50 °C, 20 min, maceração manual
P5	Solução tampão, 25 °C, 10 min, maceração manual
P6	Solução tampão, 25 °C, 20 min, maceração manual
P7	Solução tampão, 50 °C, 10 min, maceração manual
P8	Solução tampão, 50 °C, 20 min, maceração manual
P9	Água deionizada, 25 °C, 10 min, sonicação
P10	Água deionizada, 25 °C, 20 min, sonicação
P11	Água deionizada, 50 °C, 10 min, sonicação
P12	Água deionizada, 50 °C, 20 min, sonicação
P13	Solução tampão, 25 °C, 10 min, sonicação
P14	Solução tampão, 25 °C, 20 min, sonicação
P15	Solução tampão, 50 °C, 10 min, sonicação
P16	Solução tampão, 50 °C, 20 min, sonicação
P17	Água deionizada, 50 °C, 10 min, radiação micro-ondas
P18	Água deionizada, 50 °C, 20 min, radiação micro-ondas
P19	Solução tampão, 50 °C, 10 min, radiação micro-ondas
P20	Solução tampão, 50 °C, 20 min, radiação micro-ondas

### **4.3 Teor de proteínas totais**

Após a realização de cada protocolo, a concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford usando albumina sérica bovina como solução padrão. As análises

foram realizadas em um espectrofotômetro (Femto modelo 600 plus, São Paulo, Brasil) e todas as medidas foram realizadas em triplicata. Para a solubilização do padrão e diluição das amostras obtidas, 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl foi utilizada como solvente antes de cada medição.

#### 4.3.1 Separação e análise das proteínas empregando cromatografia de exclusão por tamanho

Para a obtenção dos perfis proteômicos dos protocolos avaliados, foi empregado um sistema cromatográfico que consistia em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Series 1260 infinity, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado com uma bomba quaternária, degaseificador, autoamostrador, coletor de frações e detector do tipo DAD.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suécia), sendo que para sua calibração empregou-se quatro padrões de proteínas: tiroglobulina (669 kDa); ferritina (440 kDa); aldolase (158 kDa) e conalbumina (75 kDa). Diante dos dados, construiu-se uma curva de calibração do logaritmo da massa molar das proteínas em função de seus volumes de eluição, obtendo a Equação 1, de  $r = 0,98$ , empregada para a estimativa da massas molares de compostos identificados nas frações eluídas.

$$y = 10^{-0,1514x + 4,101} \quad \text{Equação 1}$$

Na Equação 1,  $y$  representa a massa molar da proteína e  $x$  indica o volume de retenção obtido experimentalmente. As características da coluna e as condições que foram realizadas as separações estão apresentadas na Tabela 4.

A predição das massas moleculares dos compostos detectados nos eluatos dos extratos proteicos das sementes de feijão-caupi foi realizada a partir da interpolação do valor obtido para o volume de eluição na Equação 1. Os compostos que apresentaram volume de eluição antes da faixa de exclusão de massa da coluna de separação foram classificados como compostos de alta massa molecular, enquanto compostos de baixa massa molecular foram aqueles que eluíram após faixa de exclusão de massa da coluna de separação. Vale ressaltar que todas as separações foram feitas em duplicata.

**Tabela 4.** Características da coluna, condições cromatográficas e de detecção empregadas na identificação de metalobiomoléculas nos extratos obtidos a partir sementes de feijão-caupi.

<i>Condições cromatográficas</i>	
Coluna	Superdex™ 200 10/300 GL
Faixa de exclusão	10 – 600 kDa
Fase móvel	Tris-HCl 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,2
Vazão	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Tempo de corrida	70 min
Volume de injeção	50 µL
Comprimento de onda	280 nm

#### 4.3.2 Análise de componentes principais

Os cromatogramas relativos aos protocolos P4, P8, P10, P16, P18 e P20 (realizados em duplicata) foram organizados em uma matriz X de dimensão 12 x 10500, ou seja, 12 amostras e 10500 variáveis (tempos de retenção numa faixa de 0 a 70 min). A matriz foi centrada na média e a seguir aplicada a Análise de Componentes Principais (PCA). A PCA corresponde a uma técnica de projeção, em que uma matriz é projetada sobre um subespaço de dimensão reduzida, definido por componentes principais, onde diferenças e similaridades entre as amostras tornam-se mais evidentes. Portanto, a PCA realiza uma decomposição da matriz em duas matrizes de dimensões menores, uma matriz de escores que descreve as relações entre as amostras e uma matriz de pesos que descreve a relação entre as variáveis, mais uma matriz de resíduos. Os padrões nas amostras ou variáveis podem ser vistos através de gráficos de escores ou pesos, respectivamente, de uma componente principal *versus* outra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Concentração de proteínas totais

Na aplicação de cada protocolo de extração foram avaliados quatro parâmetros: 1) solvente; 2) tempo de extração; 3) temperatura e; 4) procedimento analítico. A quantificação do teor de proteínas totais foi realizada com o extrato obtido em cada protocolo de extração. Os resultados das concentrações totais das proteínas na semente de feijão-caupi estão mostrados na Tabela 5. As curvas analíticas realizadas empregando o método de Bradford apresentaram coeficientes de correlação linear (R) com valores que variaram de 0,9895 a 0,9918.

**Tabela 5.** . Concentração de proteínas totais  $\pm$  desvios padrão das médias (mg g<sup>-1</sup>, n=3) em feijão - caupi obtidas pelos diferentes protocolos de extração e determinada pelo método de Bradford (definidos pela Tabela 2).

Protocolo	Concentração de proteínas totais (mg g <sup>-1</sup> )
P1	8,75 $\pm$ 0,75
P2	64,0 $\pm$ 5,89
P3	50,7 $\pm$ 0,17
P4	67,8 $\pm$ 2,25
P5	75,4 $\pm$ 2,54
P6	77,7 $\pm$ 3,18
P7	60,5 $\pm$ 0,64
P8	86,6 $\pm$ 3,98
P9	36,9 $\pm$ 5,08
P10	70,4 $\pm$ 4,56
P11	56,1 $\pm$ 3,46
P12	52,2 $\pm$ 0,23
P13	40,3 $\pm$ 1,96
P14	72,8 $\pm$ 3,46
P15	74,1 $\pm$ 8,54
P16	83,2 $\pm$ 4,50
P17	62,3 $\pm$ 7,93
P18	74,1 $\pm$ 4,39
P19	68,9 $\pm$ 2,48
P20	78,9 $\pm$ 3,64

De acordo com os resultados da Tabela 5, os parâmetros que mais influenciaram no teor de proteínas totais foram o solvente de extração foi trocado, porém o mesmo procedimento analítico empregado. Sendo assim, quando o solvente de extração em um mesmo procedimento analítico foi usado, um aumento de 28% na quantidade de proteínas extraídas foi observado comparando os protocolos P4 e P8, 18% entre P10 e P16 e 6% entre P18 e P20. De acordo com o *test t*, apenas os protocolos P4 e P8 são significativamente diferentes a um nível de confiança de 95%. Ainda assim, estes resultados demonstram uma maior eficiência usando a solução tampão Tris-HCl como solvente no processo de extração de proteínas da semente de feijão-caupi.

Comparando-se os diferentes procedimentos analíticos, tendo a solução tampão como o melhor solvente para a extração das proteínas, a maceração manual apresentou os extratos com maiores teores de proteínas em relação aos com a energia ultrassônica e a radiação micro-ondas. Para esse resultado, uma redução de 4% na quantidade de proteínas extraídas foi observada na comparação dos protocolos P8 e P16 e de 9% entre os protocolos P8 e P20. Levando em consideração o *test t*, as comparações de P8 com P16 e P8 com P20 demonstraram não existir diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%, mostrando que a utilização da energia ultrassônica e radiação micro-ondas são alternativas interessantes para propósitos de extração de proteínas. Estudos publicados na literatura usando energia ultrassônica e radiação micro-ondas na extração de proteínas em sementes de plantas ainda são poucos e isso demonstra a necessidade de maior investigação dessas estratégias analíticas. Magalhães et al. [41] utilizou energia ultrassônica para extração de proteínas de castanhas da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.), sendo obtido extratos com elevados teores de proteínas usando a combinação baseada em maceração e sonicação.

Adicionalmente, a energia ultrassônica [42-43] e a radiação micro-ondas [44, 45] têm sido consideravelmente empregadas em estudos proteômicos, principalmente, com o objetivo de diminuir o tempo de digestão enzimática em ensaios de identificação de proteínas. Entretanto, a inserção de energia ultrassônica leva ao aumento de energia inserida e sua interação com as proteínas pode ocasionar a degradação de algumas dessas biomoléculas, reduzindo o percentual de proteínas separadas e contribuindo para diminuição da eficiência de extração. Em relação a leve diminuição na eficiência de extração envolvendo o uso da radiação micro-ondas, este resultado pode ser atribuído à degradação proteica induzida por aquecimento [46]. Além disso, ressalta-se que a radiação micro-ondas é também utilizada em processos de hidrólise de proteínas resultando na ocorrência de aminoácidos livres no meio [47-48].

Nos dois procedimentos analíticos onde houve variação de temperatura (maceração manual e energia ultrassônica), pode-se observar uma melhoria no processo de extração das proteínas quando a temperatura foi aumentada de 25 para 50 °C para a maioria dos protocolos avaliados. Na comparação do mesmo solvente utilizado, houve um aumento de *ca.* de 5 vezes entre os protocolos P1 e P3, 52% entre P9 e P11 e 84% entre P13 e P15. Além disso, de acordo com o teste *t*, a comparação dos protocolos P1 com P3, P9 com P11 e P13 com P15 mostraram resultados significativamente diferentes a um nível de confiança de 95%, destacando a influência da temperatura na eficiência de extração. Sendo assim, pode-se considerar que o aumento da temperatura é uma variável que influencia positivamente na extração das proteínas das matrizes das amostras, como no caso da semente de feijão-caupi o qual possui considerável teor de ácidos graxos e lipídios [49, 50].

Em relação ao tempo de extração, os resultados demonstraram que para a maioria dos protocolos avaliados, aqueles realizados durante 20 min foram mais eficientes na extração de proteínas do feijão quando comparado aos submetidos a 10 min de tratamento. Nesse sentido, considerando um ligeiro aumento no teor de proteínas totais, o tempo de extração de 20 minutos foi adotado para extração das proteínas de feijão-caupi.

Em conclusão, os protocolos selecionados para um estudo comparativo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram aquelas que apresentaram os maiores teores de proteínas totais para cada procedimento analítico utilizado, considerando os dois solventes. Sendo assim, para extração com maceração manual foram selecionados P4 e P8, energia ultrassônica P10 e P16 e para radiação micro-ondas, P18 e P20.

## **5.2 Avaliação dos extratos proteicos empregando HPLC-UV**

A otimização do método de extração de proteínas das sementes de feijão-caupi revelou que o solvente de extração empregado bem como o procedimento analítico empregado foram os parâmetros de maior influência sobre o teor total de proteínas obtido nos extratos do material vegetal. Embora esta informação seja relevante, fez-se necessário investigar a natureza das moléculas presentes nos extratos. Para tanto, os extratos proteicos obtidos empregando diferentes protocolos de extração foram analisado utilizando SEC-UV.

Para a análise comparativa dos extratos proteicos obtidos com o emprego dos protocolos selecionados: P4, P8, P10, P16, P18 e P20 normalizou-se previamente a



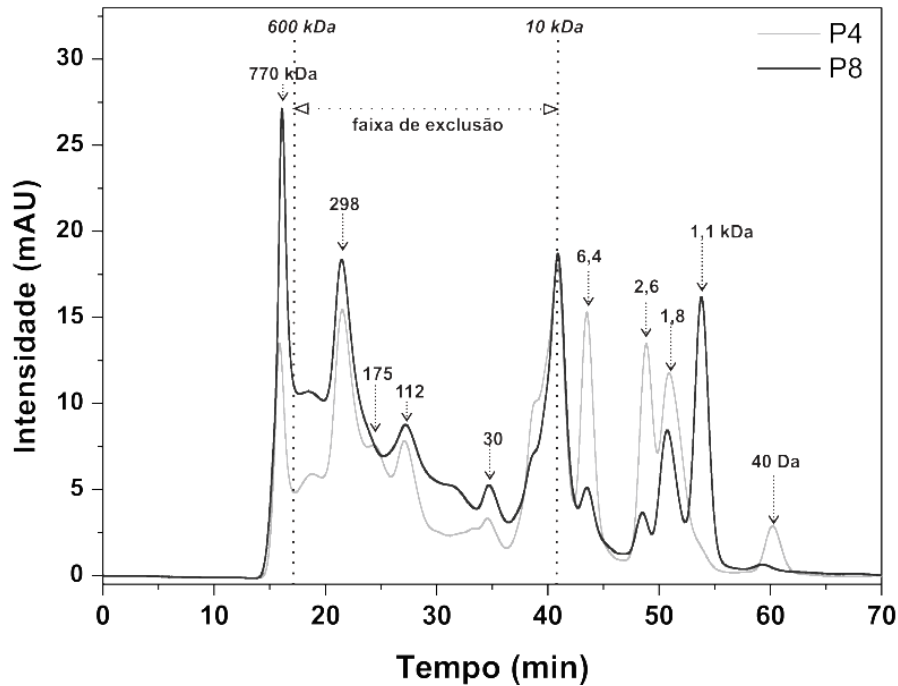
concentração para o valor de  $800 \text{ mg L}^{-1}$ . Na análise, os compostos presentes nos extratos das sementes de feijão-caupi foram separados conforme o tamanho por SEC e detectados simultaneamente por UV, operado em 280 nm. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 2-5. O tempo de corrida adotado de 70 min foi suficiente para ocorrer a eluição de todos os compostos. O tampão Tris/HCl  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,2 revelou-se uma fase móvel adequada, pois foi eficiente na solubilização das proteínas e na prevenção de possíveis interações destas com o material de preenchimento da coluna. A calibração da coluna com os padrões de proteínas possibilitou a obtenção de um adequado modelo matemático (ver Eq. 1) para estimar a massa molecular dos compostos detectados nos extratos assim como para obter o intervalo de tempo de retenção que está situada a faixa de exclusão da coluna de separação. A faixa de exclusão da coluna de 10 a 600 kDa corresponde ao intervalo de tempo de retenção de 17,5 a 41 min.

Como descrito na seção do procedimento experimental, a separação das proteínas por HPLC baseou-se na faixa de exclusão de massa da coluna para classificar os compostos em: de alta massa molecular, aquele que apresentaram sinal antes de 600 kDa, de baixa massa molecular, aqueles que foram detectados após 10 kDa. É importante ressaltar que a separação dos compostos dos extratos eluídos fora da faixa de exclusão de massa da coluna pode ter sido influenciada por mecanismos secundários (ex. troca iônica) [51], logo suas massas moleculares estimadas foram obtidas por meio da extrapolação do modelo matemático proposto (Eq. 1).

Os perfis de SEC-UV dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos empregando os protocolos P4 e P8 estão mostrados na Figura 1. Ambas as extrações foram assistidas por maceração durante 20 min a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  diferindo apenas quanto ao meio extrator, sendo usada a água, para o P4, e, o tampão Tris - HCl, para o P8. Comparando – se os perfis cromatográficos, nota-se que a intensidade dos sinais para os compostos de massas moleculares superiores a 10 kDa são maiores com o emprego do protocolo P8. Em contrapartida, compostos de massas moleculares inferiores a 10 kDa apresentam sinais mais intensos nos extratos obtidos por meio do protocolo P4, exceto, a molécula de massa molecular de 1,1 kDa que foi identificada em um sinal de elevada intensidade apenas nos extratos do protocolo P8. De modo geral, pode-se afirmar que a extractabilidade de moléculas das sementes de feijão-caupi de alta massa molecular é mais favorável com a aplicação do protocolo P8 enquanto àquelas de baixa massa molecular é maior usando o protocolo P4.

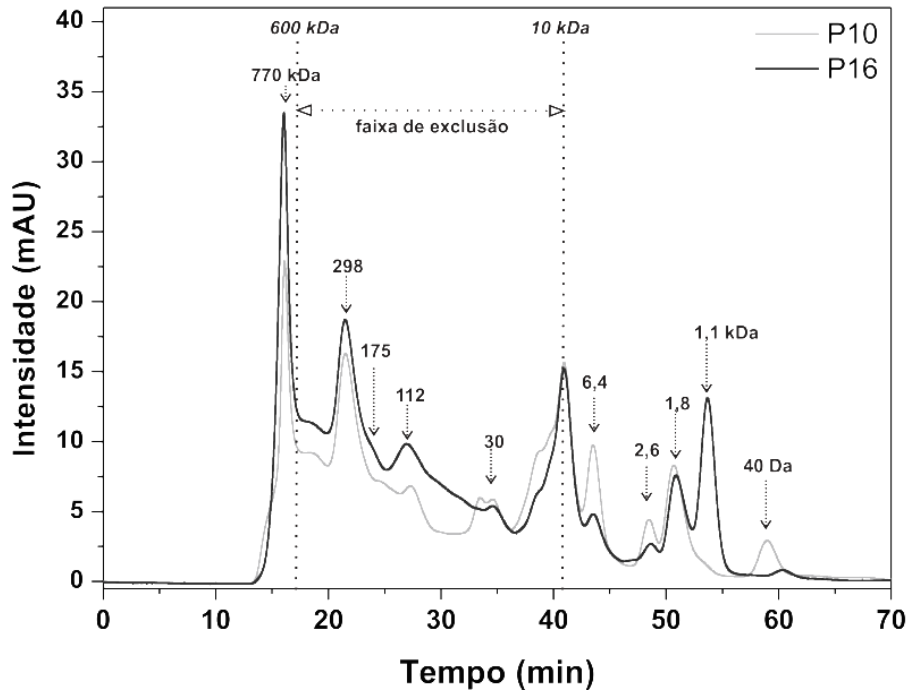
Sabendo que, aproximadamente, *ca.* 80 a 90% das proteínas presentes em sementes de plantas são globulinas, proteínas com a função de armazenamento de aminoácidos [52], os

sinais em 175 e 298 kDa podem ser atribuídos a 11S globulina. Bojórquez-Velázquez *et al.* [53] identificou 11S globulina em sementes de chia com massa molecular de 150 a 300 kDa, composta de quatro unidades monoméricas de 53,5, 52, 51,1 e 49,5 kDa, sendo cada unidade formada por uma subunidade básica e uma subunidade ácida ligadas por uma ligação dissulfeto.



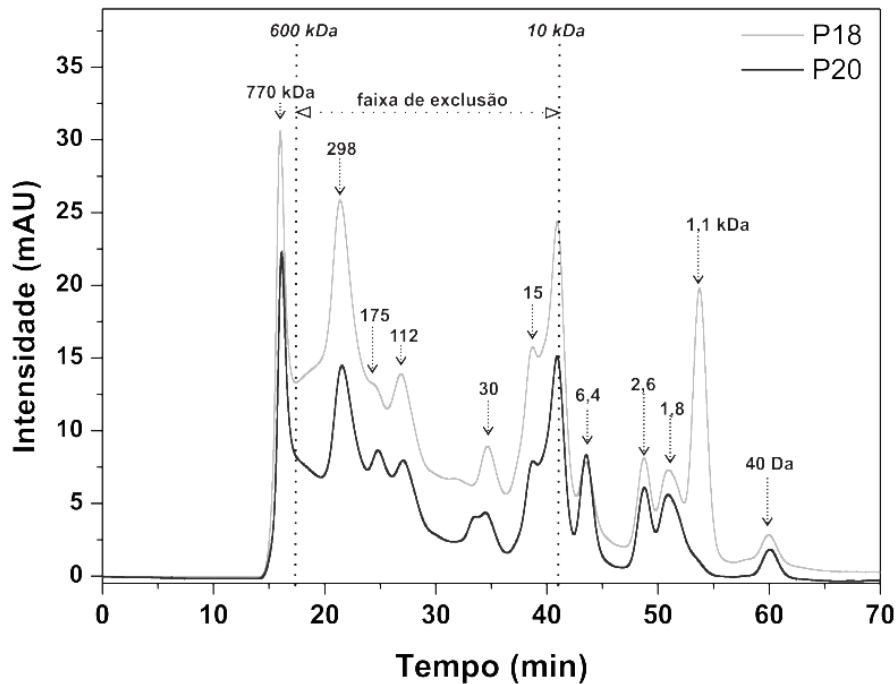
**Figura 2.** Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos protocolos P4 e P8.

Os resultados obtidos para os extratos das sementes de feijão-caupi provenientes das extrações assistida por radiação ultrassônica a 50°C por 20 min utilizando a água (P10) ou tampão (P16) como meio extrator, estão apresentados na Figura 3. Conforme as intensidades dos sinais observadas nos perfis cromatográficos, percebe-se que os compostos de massa molecular superior a 10 kDa são preferencialmente extraídos utilizando o protocolo P16 enquanto àqueles de baixa massa molecular foram mais susceptíveis a extração quando o material vegetal esteve sob ação do protocolo P10. No entanto, a molécula de massa molecular de 1,1 kDa apresentou intenso sinal somente para os extratos obtidos com emprego do protocolo P16. Tais dados revelam que a extração baseada em energia ultrassônica e tampão possibilita efetiva extração de compostos de alta massa molecular das sementes de feijão-caupi. Além disso, ressalta-se que os compostos de baixa massa molecular têm suas extrações melhoradas quando combinado radiação ultrassônica e água.



**Figura 3.** Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos protocolos P10 e P16.

Os perfis cromatográficos dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos na extração auxiliada por radiação micro-ondas a 50 °C durante 20 min em meio aquoso (P18) ou em tampão (P20) podem ser observados na Figura 4. Todos os compostos extraídos empregando o protocolo P18 apresentaram sinais mais intensos quando comparado aos do protocolo P20. Também nota-se uma extração seletiva da biomolécula de massa molecular estimada de 1,1 kDa pela extração baseada no protocolo P18, uma vez que esta foi detectada em um intenso sinal somente em extração realizada com água (ver Figura 3). A combinação de água, energia térmica e energia micro-ondas consiste em uma efetiva estratégia de extração das moléculas hidrofílicas com massa molecular de 1,1 a 770 kDa das sementes de feijão-caupi frente ao emprego de tampão. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos pelo método de Bradford, pois não existe diferença significativa entre o teor de proteínas dos extratos P18 e P20, conforme o teste t, ao nível 95% de confiança. Assim, nos extratos P20 devem apresentar possivelmente compostos que fornecem um falso positivo para o método de quantificação.



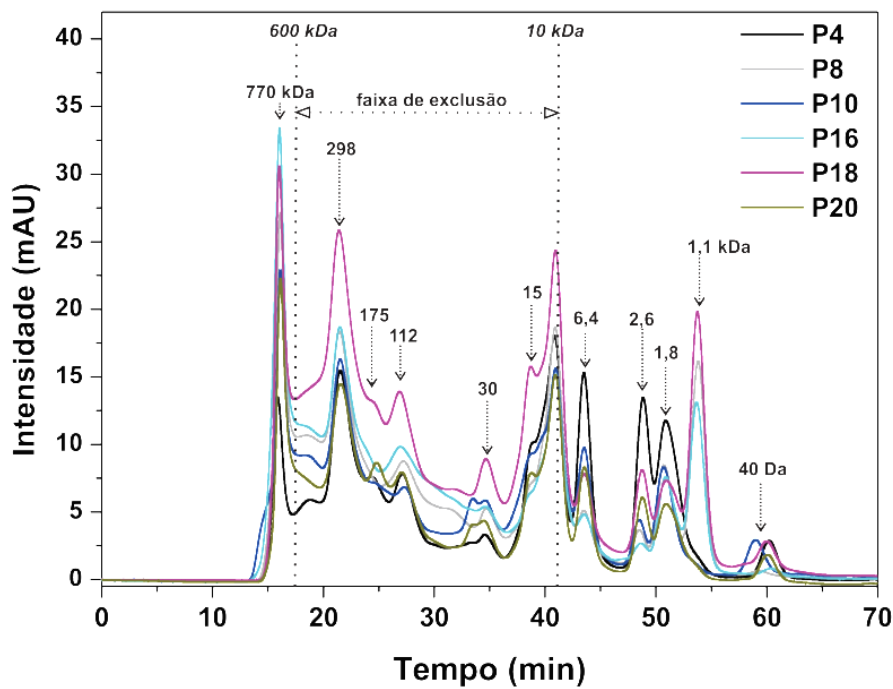
**Figura 4.** Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos protocolos P18 e P20.

A Figura 5 mostra os perfis SEC-UV dos extratos obtidos empregando maceração manual, energia ultrassônica e radiação micro-ondas a 50 °C durante 20 min com meio extrator, água ou tampão, sendo: P4, P8, P10, P16, P18 e P20, respectivamente. Conforme os resultados, o protocolo P18 pode ser considerado o mais adequado para extração de proteínas em sementes de feijão-caupi, pois, o perfil cromatográfico do extrato apresentou sinais mais intenso para os compostos de massa molecular superior a 10 kDa comparado aos dos demais procedimentos de extração.

As extrações assistidas por maceração manual e energia ultrassônica exibiram comportamento similar (ver Figura 2, 3 e 5), P8 e P16, usando tampão como meio extrator, respectivamente, foram mais eficiente para a extração dos compostos de massas moleculares superiores a 10 kDa, enquanto que P4 e P10, utilizando água para extração, mostraram mais efetivos para remoção de compostos de massas moleculares inferiores a 10 kDa da matriz vegetal. Comportamento oposto foi observado com a análise dos extratos obtidos empregando radiação micro-ondas, o protocolo P18 (água, meio extrator) apresentou-se efetivo tanto para extrações de biomoléculas de alta massa molecular quanto para aquelas de baixa massa molecular. A radiação micro-ondas melhora a extractabilidade da água, pois a biomolécula de massa molecular estimada de 1,1 kDa exibiu um intenso sinal no extrato obtido com emprego

do protocolo P18, o qual havia sido observado somente nos protocolos usando meio extrator tampão, P8 e P16, combinado a energia de fricção ou energia ultrassom.

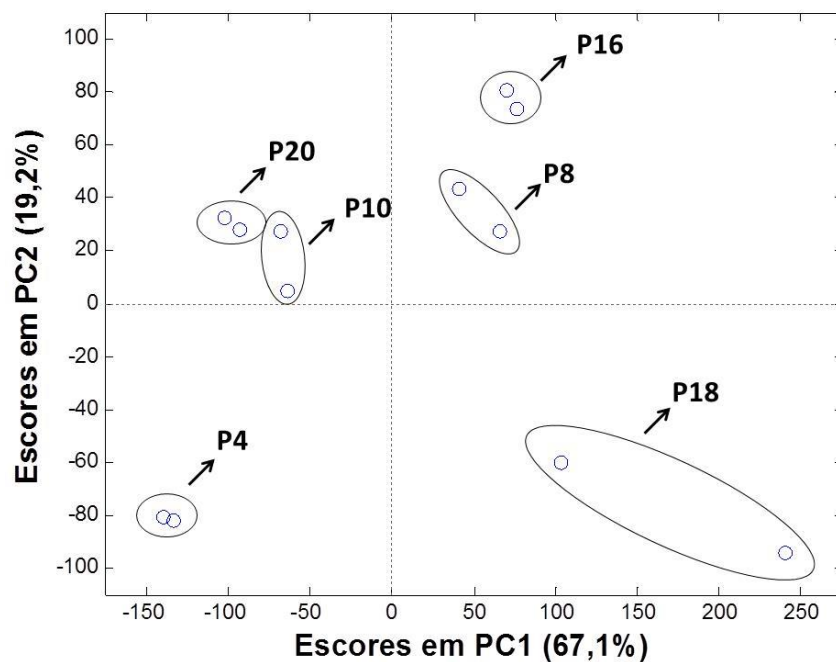
Por fim, observando que não existem diferenças significativas entre os teores proteínas totais encontrados nos diferentes extratos obtidos com a aplicação dos diferentes protocolos conforme o teste *t*, ao nível de 95% de confiança, pode-se concluir que o protocolo P18 é o que apresenta maior extractabilidade de proteínas de sementes de feijão-caupi frente aos demais protocolos propostos neste estudo, considerando as proteínas que apresentam absorção no UV. Fabre *et al.* [54] também avaliou o efeito da radiação micro-ondas, radiação ultrassom e agitação manual na extração da mucilagem de sementes de linhaça utilizando meio extrator aquoso. Ao contrario do observado em nosso estudo, a extração assistida por radiação micro-ondas é a menos eficiente, enquanto àquela por radiação ultrassom apresentou maior conteúdo de mucilagem nos extratos de linhaça após 30 min de tratamento das sementes.



**Figura 5.** Cromatograma SEC-UV (em 280 nm) dos extratos das sementes de feijão-caupi obtidos por meio do emprego dos diferentes protocolos: P4, P8, P10, P16, P18 e P20.

### 5.3 Análise de componentes principais

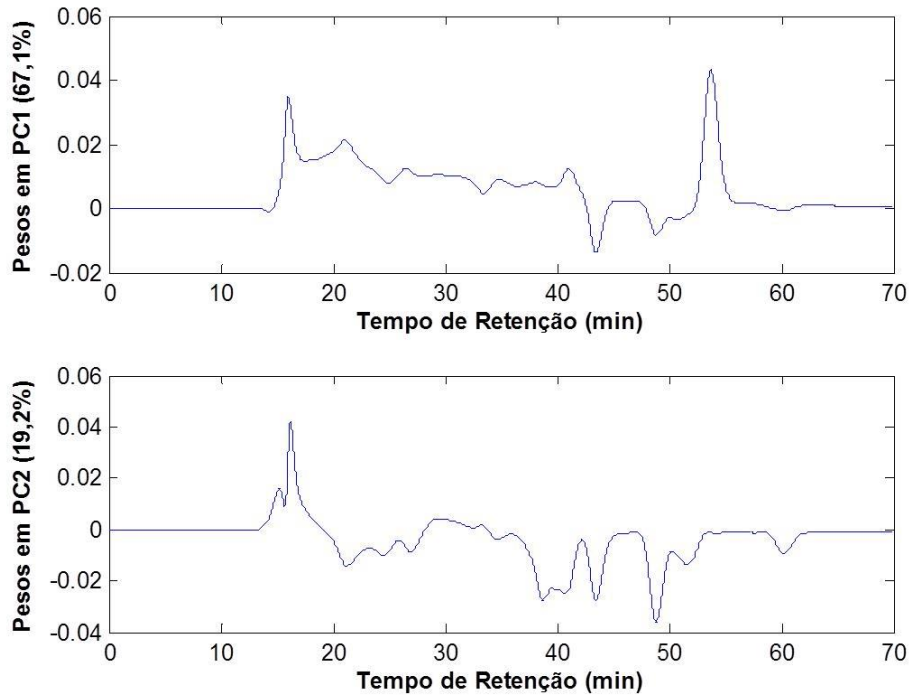
A análise de componentes principais foi realizada na matriz obtida com os perfis cromatográficos dos extratos referentes aos protocolos P4, P8, P10, P16, P18 e P20. A Figura 6 mostra o gráfico dos escores das amostras obtidos para as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), sendo a porcentagem de 86,3% da variância total do conjunto de dados explicada por estas componentes. Adicionalmente, os pesos das variáveis nas mesmas componentes são mostrados na Figura 7 na escala de tempos de retenção.



**Figura 6:** Modelo PCA para os perfis cromatográficos dos extratos dos protocolos P4, P8, P10, P16, P18 e P20. Gráfico de escores, PC1 *versus* PC2.

Observa-se na Figura 6 que as amostras relativas aos protocolos P4 e P8, ambos utilizando a assistência por maceração manual, porém distintos meios extratores diferem-se nas componentes principais, sendo as primeiras com escores negativos nas duas componentes e as últimas com escores positivos. Analisando o gráfico de pesos na Figura 7, destacam-se com valores positivos em PC1 os sinais próximos de 15 e 55 min, atribuídos a compostos de massa molecular de 770 e 1,1 kDa, respectivamente. O composto de maior massa é mais abundante nos extratos do protocolo P8, quando comparado àqueles do P4, por outro lado o composto de menor massa é completamente ausente neste último (Figura 2). Em PC2, as

variáveis relacionadas aos compostos de massas moleculares menores do que 10 kDa (entre cerca de 40 e 50 min) possuem pesos negativos, o que explica os escores negativos das amostras do protocolo P4, uma vez que, como já discutido acima estes sinais são mais intensos nestas.



**Figura 7:** Modelo PCA para os perfis cromatográficos dos extratos dos protocolos P4, P8, P10, P16, P18 e P20. Gráfico de pesos, PC1 *versus* PC2.

Os perfis cromatográficos dos extratos obtidos com o protocolo P16 mostram-se semelhantes àqueles obtidos com o protocolo P8, no subespaço gerado por PC1 e PC2, o que está relacionando com a extração dos compostos de massa molecular 770 e 1,1 kDa. De fato, isto pode ser verificado na Figura 5, onde os sinais relacionados a estes compostos destacam-se significativamente nos perfis cromatográficos citados. Comparando P16 com os extratos de P10, que a exemplo do primeiro contou com a extração assistida por radiação ultrassônica, percebe-se que nestes, apesar da maior predominância de compostos de menores massas moleculares, é inexistente o sinal relativo ao composto de massa molecular 1,1 kDa (Figura 3), o que resultou num escore negativo em PC1 para estes extratos. Ainda para P10, destaca-se o sinal intenso do composto de massa molecular 770 kDa, que possui peso positivo em PC2, resultando no escore positivo de P10 na mesma componente. De forma semelhante aos

extratos obtidos pelo protocolo P10, aqueles de P20 apresentam escores positivos em PC2 e negativos em PC1 como resultados da ausência do sinal do composto de massa molecular 1,1 kDa e do sinal intenso do composto de massa molecular 770 kDa.

Os extratos do protocolo P18 destacam-se no gráfico de escores da Figura 6, apresentando valores positivos em PC1 e negativos em PC2. Tais extratos, a exemplo daqueles do protocolo P20 foram obtidos com auxílio de radiação micro-ondas, porém com água deionizada como meio extrator. A análise dos gráficos de pesos mostra que a distribuição dos extratos de P18, no subespaço gerado por PC1 e PC2, se deve principalmente à maior intensidade dos sinais dos compostos de massa molecular de 770 e 1,1 kDa, com pesos positivos em PC1 e aos sinais dos compostos entre 600 e 10 kDa, com pesos positivos em PC1 e pesos negativos em PC2.

Os resultados demonstrados pela PCA corroboram aqueles discutidos acima para os perfis cromatográficos dos extratos, onde se observou que o protocolo P18 mostrou uma maior eficiência de extração.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objetivo deste trabalho foi eficientemente atingido demonstrando a relevante importância na avaliação detalhada de procedimentos de preparo de amostras quando o objetivo é voltado para estudos proteômicos em plantas. Com os resultados obtidos para os teores de proteínas totais para os diferentes protocolos, constatou-se que o solvente de extração, o procedimento analítico, a temperatura e o tempo de extração foram parâmetros decisivos para preservar a estrutura das proteínas após extração e aumentar a eficiência de extração. Observou-se também que as estratégias alternativas para ruptura celular, como a extração por energia ultrasônica e a radiação micro-ondas, foram eficientes na extração de proteínas em sementes de feijão-caupi.

Para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), foram selecionados os protocolos com melhores resultados na extração de proteínas. Observou-se que esta técnica mostra-se como uma excelente ferramenta de separação para estudos comparativos, mostrando as principais diferenças entre os perfis cromatográficos obtidos. Neste trabalho, destaca-se o protocolo P18 o qual foi a que melhor extraiu proteínas do feijão-caupi empregando a água como solvente extrator e por radiação micro-ondas a 50 °C durante 20 minutos.

De modo a corroborar estas diferenças, aplicou-se a análise estatística por componentes principais, onde os resultados obtidos estão em concordância com os dados cromatográficos. As duas primeiras componentes principais explicaram 86,3% da variância total dos dados, evidenciando as características principais das amostras e corroborando a análise dos perfis cromatográficos. Neste contexto, o protocolo P18 mostrou-se mais eficiente.

Finalizando, este trabalho de dissertação evidencia que uma abordagem multidisciplinar é necessária aos estudos proteômicos comparativos em organismos biológicos, os quais necessitam da aplicação de diversas ferramentas analíticas para a obtenção dos resultados, assim como, uma conexão entre diferentes áreas científicas, como a química analítica, a bioquímica e a fisiologia de plantas, para que os resultados obtidos possam ser melhores interpretados e aplicados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Borges, K.B.; Figueiredo, E.C.; Queiroz, M.E.C.; *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*, LTC: Rio de Janeiro, 2015.
2. Barbosa H. S.; Arruda, S. C. C.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 299.
3. Garcia, J. S.; Souza, G. H. M. F.; Eberlin, M. N.; Arruda, M. A. Z.; *Metallomics*, **2009**, 1, 107.
4. Barbosa, H.S.; Souza, D.L.Q.; Koolen, H.H.F.; Gozzo, F.C.; Arruda, M.A.Z.; *Anal. Methods* **2013**, 5, 116.
5. Safi, C.; Ursu, A.V.; Laroche, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.Y.; Vaca-Garcia, C.; *Algal Res.* **2014**, 3, 61.
6. Dhanani, T.; Singh, R.; Shah, S.; Kumari, P.; Kumar, S.; *Green Chem. Lett. Rev.* **2015**, 8, 43.
7. Drochioiu, G.; Ciobanu, C.I.; Bancila, S.; Ion, L.; Petre, B.A.; Andries, C.; Gradinaru, R.V.; Murariu, M.; *Ultrason. Sonochem.* **2016**, 29, 93.
8. Tu, G. L.; Bui, T.H.N.; Tran, T.T.T.; Ton, N.M.N.; Le, V.V.M.; *Food Technol. Biotech.* **2015**, 53, 479.
9. Arruda, S. C. C.; Barbosa, H. S.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z.; *Analyst* **2011**, 136, 4119.
10. Sanchez-Lucas, R.; Mehta, A.; Valledor, L.; Cabello-Hurtado, F.; Romero-Rodriguez, M. C.; Simova-Stoilova, L.; Demir, S.; Rodriguez-de-Francisco, L. E.; Maldonado-Alconada, A. M.; Jorriin-Prieto, A. L.; Jorriin-Novo, J. V.; *Proteomics* **2016**, 16, 866.
11. Vidal, N.; Barbosa, H.; Jacob, S.; Arruda, M.; *Food Chem.* **2015**, 180, 288.
12. Wanick, R. C.; Barbosa, H. S.; Frazão, L. R.; Santelli, R. E.; Arruda, M. A. Z.; Coutinho, C. C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 7661.

13. Kolenc, Z.; Vodnik, D.; Mandelc, S.; Javornik, B.; Kastelec, D.; Cerenak, A.; *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, 105, 67.
14. Frota, K. M. G.; Soares, R. A. M.; Areas, J. A. G.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2008**, 28, 470.
15. Freitas, R. M. O.; Torres, S. B.; Nogueira, N.W.; Leal, C. C. P.; Farias, R. M.; *Pesquisa Agropecuária Tropical* **2013**, 43, 370.
16. Garcia-Cristobal, J.; Garcia-Villaraco, A.; Ramos, B.; Gutierrez-Manero, J.; Lucas, J. A.; *J. Plant Physiol.* **2015**, 188, 72.
17. Guo, S.; Shan, S.; Jin, X.; Lei, Z.; Li, Z.; Zhao, L.; An, Q.; Zhang, W.; *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 150.
21. Garcia, J. S.; Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z. *Talanta* **2006**, 69, 1.
22. Wilkins, M. R.; Pasquali, C.; Appel, R. D. *Biotechnology* **1996**, 14, 61.
23. Rocha, T. L.; Da Costa, P. H. A.; Magalhães, J. C. C.; Evaristo, R. G. S.; Vasconcelos, E. A. R.; Coutinho, M. V.; Paes, N. S.; Da Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sa, M. F. *Eletroforese bidimensional e análise de proteomas*. Brasília: Embrapa, 2005.
24. Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
25. Di Ciero, L.; Bellato, C. M. Proteoma: avanços recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectroscopia de massa. *Biociência* **2002**, 29, 158.
26. Magalhães, C. S.; Garcia, J. S.; Lopes, A. S.; Figueiredo, E. C.; Arruda, M. A. Z. *Strategies for sample preparation focusing biomolecules determination/characterization*. New York: Nova Science Publishers, 2006.
27. Cañas, B.; Piñeiro, C.; Calvo, E.; López-Ferrer, D.; Gallardo, J. M. *Journal of Chromatography* **2007**, 1153, 235.

28. Davis, R. A. H. Aspectos proteômicos e determinação de elementos-traço em bÍlis de peixe: potencial marcador biológico de exposição ambiental?. *Tese* (doutorado). Rio de Janeiro: PontifÍcia Universidade Católica, 2012.
29. Silva Júnior, J. G. *Cromatografia de proteÍnas: guia teórico e prático*. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.
30. Silva, M. A. O.; Mataveli, L. R. V.; Arruda, M. A. Z. *BrJAC* **2011**, 1, 234.
31. Wagner, K.; Reccaityte, K.; Unger, K. K.; Miliotis, T.; Edholm, L. E.; Bischoff, R.; Markovarga, G. *Journal of Chromatography Part A* **2000**, 893, 293.
32. Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. *Quim. Nova* **2002**, 25, 616.
33. Matavelli, L. V. R.; Fioramonte, M.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. *Metallomics* **2012**, 4, 373.
34. Cole, D.; Cousin, S. L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, 42, 2713.
35. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Unicamp, 2006.
36. Pereira Filho, E. R. *Planejamento fatorial em quÍmica: maximizando a obtenção de resultados*. São Carlos: EdUFSCar, 2015.
37. Ribeiro, F. A. L.; Mantovani, G. A.; Poppi, R. J.; Rosario, F. F.; Bezerra, M. C. M.; Bastos, A. L. M.; Melo, V. L. A. *QuÍm. Nova* **2013**, 36, 1281.
38. Souza, A. M.; Poppi, R. J. *Quim. Nova* **2012**, 35, 223.
39. Hongyu, K.; Sandanielo, V. L. M.; Oliveira Junior, G. J. *Engineering and Science* **2015**, 1, 83.
18. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n 12 de 28 de março de 2008*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, BrasÍlia, 31 de março de 2008.

19. Junior, A. S. A (editor). *Cultivo do feijão-caupi* (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002.
20. Bastos, E. A. (coord.) *A cultura do feijão-caupi no Brasil*. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016.
40. Osborne, T. B.; *The Vegetable Proteins*, 2<sup>nd</sup> ed., Longmans Green: London, 1924.
41. Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z.; *Talanta* **2007**, 71, 1958.
42. Dycka, F.; Bobal, P.; Mazanec, K.; Babalova, J.; *Electrophoresis* **2012**, 33, 288.
43. Galesio, M.; Vieira, D. V.; Rial-Otero, R.; Lodeiro, C.; Moura, I.; Capelo, J. L.; *J. Proteome Res.* **2008**, 7, 2097.
44. Yu, Y.; Xie, L.; Gunawardena, H. P.; Khatun, J.; Maier, C.; Spitzer, W.; Leerkes, M.; Giddings, M. C.; Chen, X.; *Anal. Chem.* **2012**, 84, 9008.
45. Xu, G.; Chen, X.; Hu, J.; Yang, P.; Yang, D.; Wei, L.; *Analyst* **2012**, 137, 2757.
46. Shin, S.; Lee, A.; Lee, S.; Lee, K. J.; Kwon, J.; Yoon, M. Y.; Hong, J.; Lee, D.; Lee, G. H.; Kim, J.; *Anal. Biochem.* **2010**, 407, 281.
47. Kabaha, K.; Taralp, A.; Cakmak, I.; Ozturk, L.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 2958.
48. Afiuni-Zadeh, S.; Guo, X. H.; Azimi, G.; Lankmayr, E.; *Talanta* **2011**, 85, 1835.
49. Castellón, R. E. R.; Araújo, F. M. M. C.; Ramos, M. V.; Andrade Neto, M.; Freire Filho, F. R.; Grangeiro, T. B.; Cavada, B.S.; *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **2003**, 7, 149-153.
50. Frota, K. D. M. G.; Soares, R. A. M.; Arêas, J. A. G.; *Ciência de Tecnologia de Alimentos* **2008**, 28, 470.
51. Koplík, R.; Borková, M.; Bicanová, B.; Polák, J.; Mestek, O.; Komínková, J.; *Food Chem.* **2006**, 99, 158.

52. Chua, A. C. N.; Hsiao, E. S. L.; Yang, Y. C.; Lin, L. J.; Chou, W. M.; Tzen, J. T. C.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2008**, 72, 506.

53. Bojórquez-Velázquez, E.; Lino-López, G. J.; Huerta-Ocampo, J. A.; Barrera-Pacheco, A.; Barba de la Rosa, A. P.; Moreno, A.; Mancilla-Margalli, N. A.; Osuna-Castro, J. A.; *Food Chem.* **2016**, 192, 203.

54. Fabre, J.F.; Lacroux, E.; Valentin, R.; Mouloungui, Z.; *Ind. Crops Prod.* **2015**, 65, 354.