UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS γ -GLUTAMIL
SULFURADOS NO FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Maria de Lourdes Reis Giada

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador :

Profa. Dra. URSULA MARIA LANFER MARQUEZ

São Paulo

1995

15002

15002-F

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Reis Giada, Maria de Lourdes
R375i Isolamento, caracterização e quantificação de peptídeos γ -glutamil
sulfurados no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) / Maria de Lourdes Reis
Giada. --São Paulo, 1995.
86p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Lanfer Marquez, Ursula Maria

1. Feijão : Fração não proteica : Bioquímica dos alimentos I. T. II.
Lanfer Marquez, Ursula Maria, orientador.

641.35652 CDD

MARIA DE LOURDES REIS GIADA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS

γ -GLUTAMIL SULFURADOS NO FEIJÃO (Phaseolus vulgaris L.)

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Profa. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez

Presidente (Orientador)

Profa. Assoc. Sophia Cornbluth szarfarc

1o. Examinador

Prof. Tit. Franco Maria Lajolo

2o. Examinador

São Paulo 06 de *out* de 1995.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez, pela orientação recebida em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Nutrição Básica e Experimental da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e em particular à Maria Cristina Jesus Freitas, pela liberação, apoio e companheirismo na conquista dos mesmos ideais.

À Dra. Magaly Silva Balata, Engenheira Química e Professora Adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelos primeiros ensinamentos, incentivo e amizade ao longo destes anos, um agradecimento especial.

À Inês Maria Henrique, do Laboratório de Análise de Alimentos, Rosângela Pavan Torres, do Laboratório de Lípidos, e à Secretária Isabel Cristina Bossi Alves, pela simpatia, eficiência e presteza com que sempre atenderam as nossas solicitações.

À Rosa Maria Cerdeira Barros, do Laboratório de Propriedades Funcionais dos Alimentos, pela colaboração na análise de aminoácidos.

Aos colegas Paulo César Ludgerio da Silva e Tânia Misuzu Shiga, pela acolhida no difícil momento da chegada.

À Bibliotecária Moema Rodrigues dos Santos, da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, pela revisão e normalização das referências bibliográficas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento parcial do projeto, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo do Programa Institucional de Capacitação de Docentes (PICD).

À minha mãe Maria Zilá e aos meus irmãos Marino, Ângelo e Ângela que, com seu imenso carinho, incentivo e apoio , muito contribuíram durante a realização deste trabalho.

DEDICO

SUMÁRIO

	pág.
1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 - Ocorrência de γ -glutamil peptídeos	03
2.2 - Características químicas e isolamento de γ -glutamil peptídeos ..	04
2.3 - S-metilcisteína em leguminosas	06
2.4 - Funções da γ -glutamil-S-metilcisteína na planta	10
2.5 - Importância nutricional da γ -glutamil-S-metil-L-cisteína	12
3- OBJETIVOS	16
4- PLANEJAMENTO	17
5- MATERIAIS	18
5.1 - Feijão	18
5.2 - Reagentes	18
6- MÉTODOS	18
6.1 - Físico-químicos	19
6.1.1 - Preparo do feijão	19
6.1.2 - Obtenção do extrato nitrogenado não-protéico	19
6.1.3 - Isolamento e caracterização de γ -glutamil peptídeos	
sulfurados	20
6.1.3.1 - Purificação do Extrato Bruto por cromatografia	
de troca iônica	20

6.1.3.2 -Cromatografia em camada delgada	24
6.1.3.3 - Precipitação de proteínas do Extrato Bruto com ácido tricloroacético a 5%	26
6.1.3.4 - Hidrólise ácida dos peptídeos	26
6.2 - Biológicos	27
6.2.1 - Germinação das sementes	27
6.3 - Analíticos	28
6.3.1 - Determinação de nitrogênio total	28
6.3.2 - Determinação de umidade	28
6.3.3 - Determinação de açúcares totais	29
6.3.4 - Análise de aminoácidos com ninhidrina	29
6.3.5 - Composição em aminoácidos	29
6.3.6 - Oxidação da S-metilcisteína padrão com ácido perfórmico	30
7- RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
7.1 - Extração e obtenção do Extrato Bruto	31
7.2 - Caracterização do Extrato Bruto	32
7.3 - Isolamento de peptídeos sulfurados	34
7.3.1 - Primeira purificação (resina de troca catiônica)	35
7.3.1.1 - Determinação de aminoácidos totais	36
7.3.1.2 - Determinação de carboidratos	37
7.3.1.3 - Cromatografia em camada delgada (CCD) do Extrato Bruto e dos eluatos da resina Amberlite	38
7.3.2 - Segunda purificação (resina de troca aniônica)	43

	pág.
7.3.2.1 - Determinação de aminoácidos totais	43
7.3.2.2 - Cromatografia em camada delgada dos elutos da resina Dowex	44
7.3.3-Terceira purificação com gradiente de concentração de HAc (resina de troca aniônica)	47
7.4 - Acompanhamento da purificação pela análise de aminoácidos em autoanalisador	47
7.4.1 - Purificação por resina de troca catiônica (Amberlite IR-120)	48
7.4.2 - Purificação por resina de troca aniônica (Dowex-1)	51
7.4.3 - Purificação por resina de troca aniônica (Dowex-1) com gradiente de HAc	52
7.5 - Hidrólise ácida do Extrato Bruto.....	56
7.5.1 - Estudo do tempo de hidrólise	59
7.5.2 - Liberação de aminoácidos pela hidrólise	59
7.6 - Quantificação da S-metilcisteína total presente no feijão	61
7.7 - Comportamento da γ -glutamil-S-metilcisteína durante a germi- nação da semente de feijão	66
8- CONCLUSÕES	71
9- RESUMO/ SUMMARY	74-5
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

	Pág.
Quadro 1 - Concentrações e volumes dos aminoácidos e das amostras aplicados nas placas de cromatografia	25
Figura 1 - Esquema da extração da farinha de feijão para obtenção do Extrato Bruto (E.B) de γ -glutamil peptídeos	21
Figura 2 - Esquema da purificação do Extrato Bruto (E.B) para obtenção do (s) γ -glutamil peptídeo (s) sulfurado (s)	23
Figura 3 - Cromatografia em camada delgada unidimensional do E.B, E.B hidrolisado e dos padrões de L-aminoácidos. (A) Revelação ninhidrina e (B) revelação iodoplatinato de potássio	42
Figura 4 - Aminograma típico do Extrato Bruto e da 2a. fração do eluato em Amberlite	49
Figura 5 - Aminograma da 2a. fração do eluato em Amberlite, antes e após a hidrólise ácida	50
Figura 6 - Aminograma do eluato com água, 2a. purificação, em resina de troca aniônica (Dowex-1)	53
Figura 7 - Aminograma da 1a. fração (A), 2a. fração (B), 3a. fração (C) e 4a. fração (D) do eluato Dowex, 2a. purificação, e eluição com ácido acético 2,0 M	54
Figura 8 - (A) Aminograma do eluato Dowex, 3a. purificação, e eluição com ácido acético 0,5 M	55
Figura 8 - (B) Aminograma do eluato Dowex, 3a. purificação, e eluição com ácido acético 1,0 M	57

Figura 8 - (C) Aminograma do eluato Dowex, 3a. purificação, e eluição com ácido acético 2,0 M	58
Figura 9 - (D) Efeito do tempo de hidrólise do Extrato Bruto sobre a recuperação de alguns aminoácidos	60
Figura 10 - Aminograma do Extrato Bruto das sementes germinadas 1o. dia (A), 2o. dia (B) e 3o. dia (C)	68
Figura 11 - Aminograma do Extrato Bruto das sementes germinadas 4o. dia (D) e 5o. dia (E)	69
Tabela 1 - Teor de aminoácidos no Extrato Bruto e no eluato Amberlite.	36
Tabela 2 - Teor de carboidratos totais no Extrato Bruto e na água de lavagem da resina Amberlite	38
Tabela 3 - Cromatografia em camada delgada do Extrato Bruto, da 2a. fração do eluato Amberlite e de aminoácidos padrão, com os respectivos Rfs	39
Tabela 4 - Teor de aminoácidos totais na água de lavagem da resina Dowex e nos eluatos com ácido acético 2,0 M	45
Tabela 5 - Cromatografia em camada delgada do eluato Dowex e os respectivos Rfs	46
Tabela 6 - Teor de aminoácidos no Extrato Bruto e no Extrato Bruto hidrolisado por 3 horas a 110°C	62
Tabela 7 - Conteúdo de proteína nas sementes germinadas	70

1 - INTRODUÇÃO

Entre as leguminosas destacam-se aproximadamente 20 espécies, constituindo importante alimento protéico de origem vegetal, especialmente na América, Ásia, Índia e África, onde o suprimento das necessidades protéicas geralmente não é coberto pelas proteínas de "alto valor biológico" (Lam-Sanchez, 1989; Caniatti-Bravaca et al., 1993).

Em nosso país o feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* L. ocupa posição singular, sendo um alimento de grande consumo e elevado teor protéico (em torno de 25%), capaz de suprir em grande parte as necessidades protéicas e energéticas da população, principalmente das classes sócio-econômicas menos favorecidas.

No entanto, a reduzida utilização biológica das proteínas do feijão é bem documentada e sabe-se estar relacionada a várias causas evidenciadas ao longo dos anos por pesquisadores do mundo inteiro. Diversos fatores foram responsabilizados pelo baixo valor biológico das proteínas do feijão e entre eles destacam-se os seguintes :

- a) a reduzida quantidade e biodisponibilidade de aminoácidos sulfurados.
- b) a estrutura compacta de suas proteínas, dificultando a hidrólise enzimática.
- c) a presença de fatores antinutricionais e/ou tóxicos (inibidores de proteases, hemaglutininas, compostos fenólicos, fitatos, etc.).
- d) o armazenamento prolongado, em condições de temperatura e umidade desfavoráveis, prejudicando a textura do grão durante o cozimento e o aproveitamento biológico das proteínas.

Porém, outros aspectos possivelmente relacionados também com o aproveitamento nutricional ainda não foram explorados adequadamente. A fração nitrogenada não-protéica do feijão possui quantidade considerável de γ -glutamil peptídeos sulfurados, em especial a γ -glutamil-S-metilcisteína e a γ -glutamil metionina. Essas substâncias são amplamente distribuídas na natureza, mas com predominância nas famílias *Alliaceae* e *Leguminosae*, e em cogumelos.

Não é conhecida a função fisiológica destes peptídeos no vegetal e as suas propriedades no organismo animal após a ingestão são objeto de discussão na literatura especializada. Existem relatos sobre efeito depressor do crescimento de animais de laboratório que haviam recebido dieta com teor limitante em metionina e suplementada com S-metilcisteína, o que faz pensar num efeito tóxico deste aminoácido e do γ -glutamil peptídeo derivado. Além disso, essas substâncias podem interferir no doseamento da metionina biodisponível, determinada por métodos químicos, superestimando o teor real deste aminoácido essencial.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Ocorrência de γ -glutamil peptídeos

Os compostos γ -glutamil derivados estão largamente distribuídos na natureza e, ao que parece, ainda serão identificados em muitas outras famílias com a extensão dos estudos de aminoácidos livres em plantas. Nos últimos 30 anos mais de 70 γ -glutamil derivados de aminas e aminoácidos foram isolados de plantas, fazendo-se presentes também em animais e microrganismos.

A primeira revisão sobre os compostos γ -glutamil derivados em plantas surgiu em 1962 (Thompson et al.). Quatro anos mais tarde Waley (1966) publicou uma revisão geral a respeito dos peptídeos γ -glutamil derivados de ocorrência natural, que incluía uma lista de 25 γ -glutamil peptídeos de plantas contendo enxofre em sua molécula.

A sua ocorrência é notável nas famílias *Leguminosae* e *Alliaceae* e em cogumelos. A família *Leguminosae* tem recebido atenção maior devido a importância econômica de algumas de suas espécies como, por exemplo, o feijão. A identificação de γ -glutamil derivados em leguminosas é importante pois esta família tem se mostrado especialmente rica em aminoácidos não-protéicos, havendo necessidade de se avaliar a sua contribuição na determinação de aminoácidos essenciais (Dardenne et al., 1973). Na família *Alliaceae* o seu estudo está relacionado com a importância desses aminoácidos como precursores de flavonas (Lancaster & Kelly, 1983; Shaw et al., 1989; Lancaster & Shaw, 1991; Mutsch-Eckner et al., 1992), tendo assim um papel na liberação de compostos sulfurados de aromas voláteis, sendo alguns também biologicamente ativos como lacrimogênicos, substâncias flavorizantes e antibióticos (Kasai & Larsen, 1980). Outros γ -glutamil derivados encontrados em plantas mostraram-se tóxicos para

animais ou tem outras ações biológicas específicas (Kristensen et al., 1974; Kasai & Larsen, 1980).

2.2 - Características químicas e isolamento de γ -glutamil peptídeos

A estrutura química desses compostos é bem documentada e relativamente simples, como ilustrada a seguir :

γ - glutamil

α - glutamil

γ -L-glutamil

α -L-glutamil

De acordo com as recomendações de nomenclatura oficial (IUPAC-IUB, 1975) os γ -glutamil derivados de aminoácidos devem ser chamados como γ -glutamil, seguido pelo nome do outro aminoácido que deu origem ao peptídeo. Em vários casos, o aminoácido de origem é um aminoácido não-protéico, dando origem a um peptídeo com um nome trivial, que tem se mantido. Entretanto, também neste caso é sugerida uma sistematização da nomenclatura de acordo com a recomendação IUPAC.

Conforme a posição do segundo aminoácido, podem existir α e γ -glutamil peptídeos, podendo ser diferenciados entre si pelas suas propriedades de ionização em função do pH.

Anteriormente, a nomenclatura de muitos γ -glutamil derivados de aminoácidos foram registrados no Chemical Abstracts como derivados da glutamina, isto é, N-(1-carboxietil)glutamina. A partir de 1972, os índices do Chemical Abstracts passaram a listar os glutamil derivados de acordo com o aminoácido que deu origem ao peptídeo, precedido por N- γ -glutamil (por exemplo, N- γ -glutamilvalina) e os γ -glutamil derivados de aminas como glutamina derivados (N-etilglutamina).

De acordo com o uso comum, e com a nomenclatura oficial, a palavra peptídeo é largamente empregada para incluir todos os compostos com ligação amida entre aminoácidos.

Os γ -glutamil peptídeos e seus aminoácidos livres, normalmente encontrados na fração não-protéica, dão reação positiva com a ninhidrina e, no caso de envolverem aminoácidos sulfurados, dão reação positiva também com o iodoplatinato. Entretanto, quando esses aminoácidos sulfurados encontram-se

oxidados (sulfóxido ou sulfona de metionina, ácido cistéico) ou na forma de dissulfeto (cistina) e grupos sulfidrílicos livres (cisteína), não reagem.

O isolamento dos γ -glutamil derivados envolve normalmente extração com água, metanol-água ou etanol-água, seguido de adsorção dos aminoácidos em coluna de troca iônica e eluição com amônia ou piridina (Zacharius, 1970; Evans & Boulter, 1975; Kasai et al., 1986).

A identificação desses compostos depende da eficiência dos métodos de análise empregados. Os γ -glutamil derivados presentes em baixas concentrações nem sempre são detectados.

Com relação a estabilidade química, existem evidências que demonstram a labilidade dos compostos γ -glutamil ao tratamento ácido. Ocorre uma clivagem, resultando no ácido glutâmico e no segundo aminoácido, que pode ser parcialmente recuperado (Kasai & Larsen, 1980).

A relativa instabilidade ao oxigênio e às condições ácidas justificam também o aparecimento desses compostos na sua forma oxidada, isto é, na forma de S-metil-L-cisteína sulfóxido e γ -glutamil-S-metil-L-cisteína sulfóxido, metionina sulfóxido e γ -glutamil metionina sulfóxido, além de algumas outras formas de oxidação da molécula. Não se sabe, no entanto, se essas formas oxidadas já existem previamente na semente ou se são formadas durante o isolamento dos peptídeos.

2.3 - S-metilcisteína em leguminosas

As primeiras informações relativas especificamente ao feijão datam de 1949, quando Partridge e Westall evidenciaram a existência de substâncias sulfuradas na fração aminoacídica não-protéica de feijões, através da reação com

iodoplatinato. A identificação foi feita por comparação com a S-metilcisteína sintética.

Thompson et al. (1956) confirmaram a existência de S-metilcisteína em feijões, mas já discutem a possibilidade desse composto estar presente sob a forma de um dipeptídeo, a γ -glutamil-S-metilcisteína.

Em 1959, Zacharius et al. modificaram o método de extração e purificação, obtendo rendimento maior. A identidade do composto foi confirmada por comparação com o dipeptídeo obtido por síntese, a partir da metilação da glutathione e degradação com carboxipeptidase. A γ -glutamil-S-metilcisteína isolada do feijão correspondia a 34% do nitrogênio não-protéico do feijão. Quantidades similares foram encontradas no "Snap bean" e em "Lima beans" (Rinderknecht et al., 1958).

Em 1962, Morris et al. isolaram e purificaram outro peptídeo sulfurado, a γ -glutamil metionina a partir de feijões *P. vulgaris*, variedade kidney, embora numa concentração muito reduzida, correspondendo a 0,48% do nitrogênio não-protéico.

Análises cromatográficas em papel revelaram ainda a existência de outros compostos sulfurados na mesma fração aminoacídica não-protéica do feijão, embora presentes em menor quantidade.

Em 1970, Zacharius confirmou a elevada quantidade de γ -glutamil-S-metilcisteína no feijão (11,5 μ M /g de semente), enquanto a γ -glutamil metionina correspondia a apenas 0,506 μ M /g de semente. A hidrólise ácida do primeiro, com HCl 6,0 N, produzia ácido glutâmico, aumentando em 67% o seu teor.

Evans e Boulter (1975), determinaram o teor de S-metilcisteína em diversas leguminosas. O feijão comum (*P. vulgaris*) continha a maior concentração (0,87g

/100g de proteína), seguido de sementes de *Vigna unguiculata* (0,56%), *Vigna aureus* (0,50%) e *P. lunatus* (0,43%).

Tsou et al., em 1979, afirmaram que durante o fracionamento de proteínas do "Black gram", 46% da metionina estava presente na forma de moléculas pequenas, permeáveis à membrana de celulose, o que reforça a hipótese da presença de compostos sulfurados não-protéicos.

A partir de 1980 destacam-se Kasai et al., com a mais recente revisão sobre o assunto, fornecendo dados que cobrem a literatura existente até o final de julho de 1978 e determinando algumas propriedades e características de diversos γ -glutamil derivados, presentes principalmente em leguminosas.

Em 1986, Kasai et al. determinaram o teor de γ -glutamil-S-metilcisteína em sementes de *Vigna radiata*. Considerando o teor de proteína nessa semente de 24,5% e recalculando para proteína a concentração encontrada do peptídeo de 0,54g /g de semente, os autores isolaram 0,23g do peptídeo a partir de 100g de proteína desse feijão.

Outro enfoque foi dado por Duncan et al. em 1984, que analisaram o teor de metionina em sete variedades de feijões pela reação com brometo de cianogênio (BrCN), antes e após a extração da γ -glutamil-S-metilcisteína com etanol. A extração do dipeptídeo sulfurado reduziu em 49% o teor de metiltiocianato (MeSCN) detectado.

Durigan et al. (1987), trabalhando com BrCN após extração da γ -glutamil-S-metilcisteína, encontraram 0,96 a 1,9 de equivalentes de metionina na proteína. No entanto, esses resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores que não realizaram a extração do peptídeo e necessitam de confirmação.

Embora os compostos γ -glutamil derivados tenham sido encontrados em muitas espécies diferentes de plantas superiores, pouco se conhece sobre a distribuição destas substâncias nesses vegetais e, ainda que alguns modelos de distribuição sejam aparentes, não tem sido possível até o momento estabelecer uma divisão sistemática e classificação desses compostos em grupos botanicamente definidos. Entretanto, uma classificação estrutural é possível (Kasai & Larsen, 1980) e tem sido implementada, dividindo esses compostos em seis grupos : γ -glutamil derivados de aminoácidos protéicos, γ -glutamil derivados de aminoácidos não-protéicos, não contendo enxofre ou selênio, γ -glutamil tripeptídeos, não contendo enxofre ou selênio, γ -glutamil derivados não-protéicos, contendo aminoácidos com enxofre ou selênio, γ -glutamil tripeptídeos contendo enxofre, exceto glutathione, e γ -glutamil derivados de aminas. Contudo, muitas vezes, compostos de diferentes grupos tem sido encontrados simultaneamente na mesma planta.

Em apenas alguns poucos casos tem-se observado a presença de γ -glutamil peptídeos como compostos indicadores na química-taxonomia.

As sementes de *Vigna radiata*, leguminosa comestível, nativa da Ásia e cultivada especialmente na Índia, são muito semelhantes em peso e tamanho às da *Vigna mungo*, mas podem ser facilmente distinguidas entre si. As sementes de *Vigna mungo* contêm alta concentração de γ -glutamil-S-metilcisteína e seu correspondente sulfóxido, enquanto as sementes de *Vigna radiata* são ricas em γ -glutamil metionina e seu sulfóxido (Otol et al., 1975), mostrando mais uma vez a importância de um padrão de classificação botânica para a distribuição desses compostos.

Assim, a família *Leguminosae* foi classificada em três grupos (Kasai et al., 1975): sementes contendo elevadas concentrações de γ -glutamil fenilalanina e γ -glutamil tirosina, sementes contendo concentrações muito baixas ou nulas de γ -glutamil fenilalanina e γ -glutamil tirosina, mas elevadas concentrações de outros γ -glutamil peptídeos e, finalmente, sementes contendo baixa concentração ou nenhuma de γ -glutamil peptídeos.

Diversas variedades de feijões do gênero *Phaseolus*, os quais são usados como alimento, pertencem ao segundo grupo (*P. radiatus*, *P. angularis*, *P. vulgaris* e *P. lunatus*).

2.4 - Funções da γ -glutamil-S-metilcisteína na planta

Somente em poucos casos informações detalhadas da biossíntese e transformação de cada γ -glutamil peptídeo nos vegetais são disponíveis. Embora tenha-se sugerido inicialmente que a maioria desses compostos seja sintetizada e acumulada nas sementes, alguns foram identificados também em partes frescas das plantas, porém em baixas concentrações (Kasai & Larsen, 1980). Em vegetais do gênero *Allium*, o acúmulo ocorre nos tecidos e a atividade da enzima γ -glutamil transpeptidase foi responsabilizada pela sua síntese (Thompson et al., 1964).

As γ -glutamil transpeptidases (γ -glutamil transpeptidases, γ -glutamil peptídeo: amino ácido γ -glutamil transferase, Ec 2.3.2.2), largamente distribuídas em animais e microrganismos, também tem sido identificadas em plantas, sendo muito intensivamente estudadas no *P. vulgaris* (Thompson et al., 1964; Goore & Thompson, 1967).

Mais recentemente, tem-se atribuído também à esta enzima uma ação de degradação de γ -glutamil peptídeos, verificada durante a germinação das

Embora os compostos γ -glutamil derivados tenham sido encontrados em muitas espécies diferentes de plantas superiores, pouco se conhece sobre a distribuição destas substâncias nesses vegetais e, ainda que alguns modelos de distribuição sejam aparentes, não tem sido possível até o momento estabelecer uma divisão sistemática e classificação desses compostos em grupos botanicamente definidos. Entretanto, uma classificação estrutural é possível (Kasai & Larsen, 1980) e tem sido implementada, dividindo esses compostos em seis grupos : γ -glutamil derivados de aminoácidos protéicos, γ -glutamil derivados de aminoácidos não-protéicos, não contendo enxofre ou selênio, γ -glutamil tripeptídeos, não contendo enxofre ou selênio, γ -glutamil derivados não-protéicos, contendo aminoácidos com enxofre ou selênio, γ -glutamil tripeptídeos contendo enxofre, exceto glutathione, e γ -glutamil derivados de aminas. Contudo, muitas vezes, compostos de diferentes grupos tem sido encontrados simultaneamente na mesma planta.

Em apenas alguns poucos casos tem-se observado a presença de γ -glutamil peptídeos como compostos indicadores na química-taxonomia.

As sementes de *Vigna radiata*, leguminosa comestível, nativa da Ásia e cultivada especialmente na Índia, são muito semelhantes em peso e tamanho às da *Vigna mungo*, mas podem ser facilmente distinguidas entre si. As sementes de *Vigna mungo* contêm alta concentração de γ -glutamil-S-metilcisteína e seu correspondente sulfóxido, enquanto as sementes de *Vigna radiata* são ricas em γ -glutamil metionina e seu sulfóxido (Otol et al., 1975), mostrando mais uma vez a importância de um padrão de classificação botânica para a distribuição desses compostos.

Assim, a família *Leguminosae* foi classificada em três grupos (Kasai et al., 1975): sementes contendo elevadas concentrações de γ -glutamil fenilalanina e γ -glutamil tirosina, sementes contendo concentrações muito baixas ou nulas de γ -glutamil fenilalanina e γ -glutamil tirosina, mas elevadas concentrações de outros γ -glutamil peptídeos e, finalmente, sementes contendo baixa concentração ou nenhuma de γ -glutamil peptídeos.

Diversas variedades de feijões do gênero *Phaseolus*, os quais são usados como alimento, pertencem ao segundo grupo (*P. radiatus*, *P. angularis*, *P. vulgaris* e *P. lunatus*).

2.4 - Funções da γ -glutamil-S-metilcisteína na planta

Somente em poucos casos informações detalhadas da biossíntese e transformação de cada γ -glutamil peptídeo nos vegetais são disponíveis. Embora tenha-se sugerido inicialmente que a maioria desses compostos seja sintetizada e acumulada nas sementes, alguns foram identificados também em partes frescas das plantas, porém em baixas concentrações (Kasai & Larsen, 1980). Em vegetais do gênero *Allium*, o acúmulo ocorre nos tecidos e a atividade da enzima γ -glutamil transpeptidase foi responsabilizada pela sua síntese (Thompson et al., 1964).

As γ -glutamil transpeptidases (γ -glutamil transpeptidases, γ -glutamil peptídeo: amino ácido γ -glutamil transferase, Ec 2.3.2.2), largamente distribuídas em animais e microrganismos, também tem sido identificadas em plantas, sendo muito intensivamente estudadas no *P. vulgaris* (Thompson et al., 1964; Goore & Thompson, 1967).

Mais recentemente, tem-se atribuído também à esta enzima uma ação de degradação de γ -glutamil peptídeos, verificada durante a germinação das

sementes de leguminosas (Kasai et al., 1982) ou mesmo de bulbos (Fenwick & Hanley, 1985).

Por outro lado, além da possibilidade de que alguns γ -glutamil derivados possam ser produzidos como compostos intermediários durante a degradação da glutathione pela ação das transpeptidases, a produção destes como intermediários também durante a síntese da glutathione, pela γ -glutamil cisteína sintetase, e da glutamina, pela glutamina sintetase, não pode ser excluída.

Está claro, portanto, que no estágio atual do conhecimento as γ -glutamyl transpeptidases ou γ -glutamil transferases tem papel no metabolismo dos γ -glutamyl peptídeos, mas é impossível concluir que a presença de tais enzimas, pode em todos os casos, explicar a ocorrência de γ -glutamil derivados.

Enquanto nenhuma investigação sistemática dos níveis de concentração de γ -glutamyl peptídeos através do ciclo de vida das plantas tenha sido relatada, várias informações com respeito ao isolamento e concentração destes peptídeos, bem como mudanças nesta concentração, tem demonstrado que os γ -glutamil derivados presentes em sementes desaparecem durante a germinação. A γ -glutamyl leucina e a γ -glutamyl-S-metilcisteína só puderam ser encontradas nos cotilédones e nas sementes maduras, desaparecendo durante a germinação e não podendo ser encontradas nas raízes, haste ou folhas do *P. vulgaris* (Watanabe et al., 1971).

Da mesma forma, não foi possível evidenciar um papel comum à todos os γ -glutamyl derivados em plantas, embora a possibilidade de que alguns possam ter papéis específicos não possa ser excluída. A função fisiológica dos compostos γ -glutamyl na planta é fonte de especulação. Sugeriu-se que os γ -glutamyl peptídeos possam ser metabólitos envolvidos no armazenamento de compostos de nitrogênio

e enxofre, adquirindo função de reserva (Kasai & Larsen, 1980). De fato, em alguns casos os compostos γ -glutamil derivados de aminoácidos protéicos ocorrem em elevadas concentrações e precisam ser levados em consideração na determinação do conteúdo de aminoácidos essenciais em sementes (Dardenne et al., 1973). Talvez outra função desses compostos esteja relacionada com o transporte de aminoácidos através da membrana celular (Kasai & Larsen, 1980), num processo semelhante ao proposto para animais e microrganismos. Somente informações limitadas são disponíveis com respeito ao transporte de aminoácidos através das membranas das células nas plantas (Nissen, 1974; Poole, 1976). Sugeriu-se também que o acúmulo de aminoácidos não-protéicos durante a maturação da semente induziria a planta a sintetizar γ -glutamil derivados, devido a impossibilidade de inseri-los em proteínas. Neste caso, o processo seria um mecanismo de detoxificação (Nigam & McConnell, 1969), apesar do objetivo da planta produzir aminoácidos não protéicos como a S-metilcisteína seja obscuro (Benevenga, 1974).

Na família *Alliaceae*, os γ -glutamil peptídeos vem sendo estudados como precursores de aromas, compostos voláteis organossulfurados parcialmente formados pela degradação enzimática da S-metilcisteína (Chin & Lindsay, 1994).

2.5 - Importância nutricional da γ -glutamil-S-metil-L-cisteína

Sabe-se que em adição aos aminoácidos protéicos, cerca de 130 L- α -aminoácidos sem enxofre ou selênio, 35 iminoácidos e 8 β , γ ou δ -aminoácidos podem ocorrer em plantas superiores e cogumelos. Muitos outros, presumivelmente, permanecem por serem encontrados exatamente como vários aminoácidos não-protéicos tem sido encontrados nas plantas a cada ano. Desta

forma, a possibilidade de aparecimento de novos γ -glutamil derivados são consideráveis (Kasai & Larsen, 1980).

Entretanto, esses compostos ainda estão pouco estudados. A literatura existente sobre o assunto apresenta poucos dados, muitas vezes contraditórios, no que se refere ao efeito desses compostos no organismo que os ingere. Evans e Boulter (1975) não verificaram o efeito tóxico mas também não encontraram um significado nutricional para a S-metilcisteína. A S-metilcisteína e a metionina são semelhantes sob o ponto de vista estrutural, diferindo em apenas um átomo de carbono na cadeia lateral. Assim, a S-metilcisteína poderia exercer ação semelhante a da metionina, a de doador de grupos metila, pela presença do grupo tiometila. Assim, por exemplo, outro análogo da metionina, o ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanóico, que difere da metionina apenas pela substituição do grupo amina por um grupo hidroxila, vem sendo utilizado na alimentação de aves como substituto parcial da metionina (Day et al., 1983).

Por outro lado, Friedman e Gumbmann, em 1984, verificaram que camundongos alimentados com uma dieta à base de aminoácidos sintéticos e substituindo a metionina por diversos derivados da cisteína, incluindo a S-metil-L-cisteína, tiveram o menor crescimento entre todos os derivados testados. Este crescimento foi de apenas 13% em relação a dieta controle contendo teor limitante de metionina na ração (1,17%). Estes resultados parecem indicar uma ação tóxica da S-metil-L-cisteína, confirmando observações de Benevenga (1974) e Benevenga et al. (1976) de um efeito depressor do crescimento de ratos, mesmo na presença de metionina. Kasai e Larsen (1980) também se referem a um efeito tóxico. Por outro lado, Eyre et al. (1983) não observaram nenhuma alteração no valor biológico de *Vicia faba* L., quando suplementada com S-metil-L-cisteína. Não

se sabe também se os seus aminoácidos constituintes podem ser utilizados para síntese de proteínas pelo organismo (Dou & Krull, 1990).

Por outro lado, inúmeras investigações científicas demonstram a deficiência de aminoácidos sulfurados em proteínas de leguminosas, incluindo o feijão. A concentração de metionina e cisteína no feijão é de 1/3 do teor encontrado na proteína do ovo, proteína esta considerada nutricionalmente ideal. Considerando as diversas publicações sobre o assunto, os teores de metionina no feijão se situam entre 1,1 e 2,2 g /100 g de proteína. Os teores encontrados em amostras cultivadas em nosso país, variam entre 0,4 e 1,73%, tendo sido empregadas diferentes metodologias para a sua análise (Herrick et al., 1972; Tobin & Carpenter, 1978; Sgarbieri et al., 1979; Antunes & Sgarbieri, 1980; Costa de Oliveira et al., 1987; Durigan et al., 1987; Koehler & Burke, 1988; Rayas-Duarte et al., 1988; Peace et al., 1988; Tezoto & Sgarbieri, 1990; Sgarbieri & Galeazzi, 1990).

Concomitantemente aos estudos relativos à determinação quantitativa da metionina, importância foi dada às pesquisas relacionadas com a sua biodisponibilidade, bem como às causas que levam a mesma. A biodisponibilidade da metionina do feijão, avaliada através de ensaios biológicos, não parece ultrapassar os 50%, o que explica, ao menos em parte, o reduzido valor nutricional do feijão (Evans et al., 1974; Evans & Bauer, 1978; Sgarbieri et al., 1979; Durigan et al., 1987). A metionina total, determinada por cromatografia de troca iônica em autoanalisador, na forma química de sulfona de metionina, pode não estar disponível para utilização pelo organismo animal, fato que não pode ser detectado pela análise após o procedimento de hidrólise ácida e cromatografia em autoanalisador. A dificuldade encontrada em avaliar a disponibilidade da metionina por meios de ensaios com animais, vem motivando há anos os pesquisadores,

para o desenvolvimento de reações químicas específicas para a metionina não oxidada, considerada biodisponível.

A metionina não oxidada reage com nitroprussiato de sódio, formando um complexo colorido, medido espectrofotometricamente. Esta reação, inicialmente empregada por McCarthy e Sullivan (1941) e posteriormente modificada (Tannenbaum et al., 1969; Lunder, 1973) não mostra uma reprodutibilidade adequada, pois o tratamento com carvão ativo nem sempre é eficiente para remover pigmentos interferentes presentes no feijão. No entanto, este método tem sido aplicado com sucesso na estimativa da metionina biodisponível em proteína isolada do feijão (Genovese & Lajolo, 1993).

A reação da metionina com brometo de cianogênio (BrCN) formando quantidades estequiométricas de metiltiocianato (MeSCN), quantificada por cromatografia em fase gasosa, tem sido outro método frequentemente utilizado para determinar o teor de metionina quimicamente disponível em feijões (Ellinger & Duncan, 1976; Duncan et al., 1984).

Com o objetivo de obter maiores informações relativas a metionina presente no feijão e nas suas principais frações protéicas isoladas, Lanfer Marquez et al. (in press) determinaram a metionina total e disponível em sementes de feijão e nas suas principais frações protéicas, procurando evidenciar alguma fração que fosse mais rica em metionina ou que contivesse maior quantidade de metionina quimicamente disponível. Os resultados evidenciaram um teor maior de metionina disponível do que de metionina total no feijão integral, o que pode ser explicado pelo fato de existirem em feijões, e em algumas outras leguminosas, compostos sulfurados não-protéicos, como é o caso da S-metilcisteína livre ou na forma de γ -glutamil peptídeo que também produzem MeSCN pela reação com BrCN. Assim, a

reação da metionina com BrCN, que parecia ser específica para a metionina disponível, também produziu MeSCN pela reação com a γ -glutamil S-metilcisteína e parece ter resultado em valores superestimados de metionina disponível para o feijão integral. Considerando que o feijão possui um teor médio de metionina de cerca de 1,40 g /100 g de proteína, outros autores concluíram que o método da reação da metionina com BrCN, frequentemente empregado para determinar o teor de metionina biodisponível, pode superestimar em 41% o teor real de metionina.

Nas frações protéicas isoladas, o teor de metionina disponível era aproximadamente 35% menor do que o total, pois não havia substâncias interferentes.

Com base nas informações encontradas na literatura existente até o presente, parece ser importante a realização de novos estudos visando aprofundar os conhecimentos sobre essas substâncias sulfuradas, conhecer a sua identidade, avaliar a sua contribuição no doseamento da metionina e no teor real e biodisponível de aminoácidos sulfurados em feijões, protéicos ou não, bem como inferir sobre os mecanismos de sua biodisponibilidade e sua ação biológica.

3 - OBJETIVOS

Pelo exposto, estabelecemos como objetivo geral do presente trabalho estudar os peptídeos γ -glutamil sulfurados em feijões e os objetivos específicos foram :

- 3.1 - Padronizar técnicas para a extração e purificação de γ -glutamil peptídeos sulfurados em feijões (*Phaseolus vulgaris* L.).

- 3.2 - Caracterizar quimicamente e identificar esses compostos.
- 3.3 - Quantificar o(s) peptídeo(s) γ -glutamil sulfurado(s) (γ -glutamil-S-metilcisteína e γ -glutamil metionina) existentes nas semente de feijão
- 3.4 - Avaliar a sua contribuição nos teores de metionina total e biodisponível em feijões
- 3.5 - Estudar o comportamento dos peptídeos γ -glutamil sulfurados durante a germinação da semente de feijão.

4 - PLANEJAMENTO

Os objetivos propostos foram desenvolvidos em várias etapas sucessivas, no sentido de se obter informações sobre a presença e identidade de γ -glutamil peptídeos no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Inicialmente foram estabelecidos e otimizados os procedimentos para a obtenção da fração nitrogenada não-protéica e o isolamento dos peptídeos γ -glutamil sulfurados. A purificação foi efetuada por passagem sucessiva dos extratos por resinas de troca catiônica e aniônica, acompanhando-se a purificação por testes químicos, cromatografia em camada delgada e análise de aminoácidos com ninhidrina.

A caracterização química e a identificação dos referidos peptídeos foi efetuada por método instrumental e a quantificação dos mesmos, após hidrólise ácida pela determinação da S-metilcisteína liberada.

Com o objetivo de contribuir para a elucidação da possível função fisiológica deste peptídeo em plantas, foi realizado um estudo de germinação do feijão, acompanhando-se o comportamento da γ -glutamil-S-metilcisteína durante o processo germinativo.

5 - MATERIAIS

5.1 -Feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) , cultivar IAC-Carioca, Lote nº IT-223/93, foi adquirido do produtor, tendo sido cultivado na região da Paranapanema, Itapetininga, Estado de São Paulo e colhido em 10/07/93.

5.2 -Reagentes

Metilcelosolve (etilenoglicolmonometil éter), ácido fórmico, ácido bromídrico, peróxido de hidrogênio, L-leucina e sílica gel 60G da E. Merck; ninhidrina da Pierce Chemical Company; padrões de L-aminoácidos, S-metil-L-cisteína, resina de troca catiônica Amberlite IR-120 Plus, resina de troca aniônica Dowex 1, ninhidrina spray reagente e iodoplatinato de potássio spray reagente da Sigma Chemical Company; tampões eluentes, reagente de ninhidrina e mistura padrão de aminoácidos utilizados no autoanalisador de aminoácidos da Beckman Instruments; D-manose da Inlab; membrana de filtração com poros de 0,22 μ GSWPO 1300 da Millipore Corporation. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

6 - MÉTODOS

6.1 - Físico-químicos

6.1.1 - Preparo do feijão

As sementes, que apresentaram no momento da análise 12,4% de umidade e 24,58% de proteínas, foram pulverizadas em moinho analítico (Polymix modelo A-10 Kinematica/ Luzern) e tamisadas até passarem por uma malha de 0,250 mm. As sementes íntegras foram armazenadas a uma temperatura de 4° C, em sacos plásticos, até o preparo das amostras para as análises.

6.1.2 - Obtenção do extrato nitrogenado não-protéico

A farinha de feijão foi extraída com etanol a 70%, basicamente de acordo com o procedimento adotado por Kasai et al. (1986) na extração de γ -glutamil peptídeos de *Vigna radiata*, com pequenas modificações. Os autores realizaram a extração a partir de 3 kg de semente, enquanto foi adotada em nosso laboratório a extração repetida de pequenas quantidades.

A farinha de feijão (50g) foi extraída com 250 ml de etanol a 70% por 2 dias, em câmara fria a 4° C, sob agitação. A suspensão foi centrifugada em centrífuga Sorvall R.C-5B (Du Pont Instruments) em 10.000 rpm a 10° C por 30 min., e o resíduo reextraído com o mesmo volume de etanol a 70% empregado na primeira extração, e nas mesmas condições de temperatura e tempo. Os sobrenadantes das duas extrações foram combinados e concentrados à vácuo em rotaevaporador (Büchi) à temperatura máxima de 40° C, até um volume de 50 ml.

A amostra concentrada foi lavada com 20 ml de clorofórmio por 4 vezes e as fases separadas em funil de separação. A lavagem com clorofórmio tem a finalidade de remover o álcool do extrato, o que provoca a precipitação de proteínas co-extraídas. A fase aquosa, que agora continha proteínas precipitadas,

foi centrifugada a 10.000 rpm a 10° C por 30 min. e o sobrenadante completado com água destilada para 100 ml. Este extrato foi denominado daqui por diante de Extrato Bruto (E.B.).

O esquema simplificado da extração encontra-se na Figura 1.

6.1.3 - Isolamento e caracterização de γ -glutamil peptídeos sulfurados

6.1.3.1 -Purificação do Extrato Bruto por cromatografia de troca iônica

Uma coluna de vidro de 30 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro foi empacotada com 25 ml de resina de troca catiônica Amberlite IR-120 (H^+ , 32,5 meq.) equilibrada com HCl 2,0 M. Foram aplicados 5 ml do E.B e a coluna lavada com água (300 ml, coletados em uma fração de 200 ml e duas de 50 ml cada) até reação negativa para carboidratos, pelo método de fenol- H_2SO_4 . Os aminoácidos foram eluídos com NH_4OH 2,0 M (350 ml, coletados em sete frações de 50 ml cada). As frações 2 e 3 foram reunidas e utilizados 5ml para aplicação numa coluna de troca aniônica (25 ml) Dowex 1x4 (acetato⁻, 25 meq.). A coluna foi lavada com água (125 ml, coletados em uma fração de 50 ml e três de 25 ml cada) para remoção dos aminoácidos básicos e de grande parte dos aminoácidos neutros. Os aminoácidos ácidos foram eluídos com ácido acético 2,0 M (175 ml, coletados em uma fração de 50 ml e quatro de 25 ml cada). Os eluatos, após seu volume ser reduzido para 5 ml cada, foram reunidos e aplicados novamente na coluna Dowex 1x4 (acetato⁻) e os aminoácidos eluídos em quatro frações com um gradiente de concentração de ácido acético 0,2 M; 0,5 M; 1,0 M e 2,0 M. Foram coletadas 125 ml em uma fração de 50 ml e três de 25 ml para cada concentração de ácido acético.

FIGURA 1. Esquema da extração da farinha de feijão para obtenção do Extrato Bruto (E.B.) de γ -glutamil peptídeos

Todo o processo de purificação foi realizado a baixa temperatura (4°C) devido a labilidade do peptídeo à hidrólise tanto alcalina como ácida.

Para acompanhar com maior facilidade os passos da purificação apresentamos na Figura 2 o esquema simplificado da purificação do E.B.

Todos os volumes de eluição foram previamente otimizados. As diversas frações obtidas pela eluição da coluna Amberlite e Dowex, a um fluxo do eluente de 1,2 ml/ min., foram posteriormente liofilizadas a 25° C, ressuspensas em água, ou tampão citrato Na-S (Beckman), próprio para a análise de aminoácidos no autoanalisador, e utilizadas para as diversas determinações analíticas e análises de aminoácidos, respectivamente.

Após a liofilização, a primeira fração água Amberlite foi ressuspensa para 100 ml e a segunda e terceira frações para 10 ml cada. Foi determinado o teor de açúcares totais para cada uma das três frações pelo método do fenol-H₂SO₄. A segunda e terceira frações NH₄OH 2,0 M Amberlite foram ressuspensas para 10 ml cada e as cinco demais para 5 ml cada. Todas as frações Dowex foram ressuspensas para 5 ml cada.

Em todas as frações dos eluatos Amberlite e Dowex foi determinado o teor de α -aminonitrogênio pela reação com ninhidrina. Os valores de absorbância após reação dos aminogrupos com ninhidrina, foram corrigidos pela absorbância proveniente da reação da ninhidrina com o NH₄OH utilizado na eluição da resina de troca catiônica.

FIGURA 2. Esquema da purificação do Extrato Bruto (E.B.) para obtenção do (s) γ -glutamil peptídeo (s) sulfurado (s).

Preparo e regeneração das resinas

A resina Amberlite IR-120 foi preparada e, após cada uso, regenerada pela passagem de 500 ml de NaOH 2,0 M para remoção de íons, seguida de lavagem com água até pH neutro. Logo após foi ativada, isto é substituídos os íons Na^+ por H^+ , pela passagem de 500 ml de HCl 2,0 M, seguida da lavagem com água, até pH neutro.

A resina Dowex 1, comercialmente adquirida, encontra-se na forma cloreto-. Para obtenção da forma acetato- a resina foi primeiramente lavada com 500 ml de NaOH 1,0 M e, em seguida, com água, até ausência de eletrólitos. Logo após, foi transformada para a forma acetato- pela passagem de 50 ml de ácido acético 2,0 M, seguida da lavagem com água até pH neutro. Esse procedimento foi também adotado para regeneração da resina após cada uso.

6.1.3.2 -Cromatografia em camada delgada

Placas de vidro de 20 x 20 cm foram utilizadas aplicando-se sílica gel 60 G para cromatografia em camada delgada (CCD), na espessura de 0,20 mm. Empregou-se a proporção de 36 g de sílica gel em pó para 80 ml de água, material suficiente para 5 placas.

As placas foram secas à temperatura ambiente e ativadas durante 1 hora em estufa à 110° C antes do uso.

O comportamento do E.B. e dos eluatos Amberlite e Dowex, bem como de seus hidrolisados, foram estudados mediante comparação com padrões de L-aminoácidos nas seguintes concentrações e respectivos volumes aplicados na placa, conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Concentrações e volumes dos aminoácidos e das amostras aplicados nas placas de cromatografia

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{moles/ } 10 \mu\text{L}$)	VOLUME (μL)
Metionina	0,13	10
Metionina-sulfóxido)	0,13	10
Cisteína	0,75	10
S-metilcisteína	0,13	10
Ácido Glutâmico	0,38	10
Ácido Aspártico	0,50	30
Leucina	0,50	10
Extrato Bruto	0,22	10
Extrato Bruto hidrolisado	0,22	10
Eluato Amberlite	0,21	40
Eluato Amberlite hidrolisado	0,21	40
Eluato Dowex	0,20	50
Eluato Dowex hidrolisado	0,20	50

Para os testes de cromatografia em camada delgada unidimensional foi usada como fase móvel a mistura de n-BuOH-HAc-H₂O (n-Butanol, Ácido Acético e Água) na proporção de 4:1:1 (v/v/v), que se mostrou melhor do que na proporção 4:1:2.

As placas foram reveladas com ninhidrina e iodoplatinato de potássio .

Revelação com iodoplatinato de potássio

O reagente iodoplatinato de potássio é borrifado na placa de sílica gel completamente seca e compostos sulfurados reduzidos, tais como metionina e S-metilcisteína, aparecem como manchas brancas sobre um fundo róseo. Compostos

sulfurados oxidados (sulfóxido e sulfona de metionina, ácido cisteico) ou na forma de dissulfeto (cistina) e grupos sulfidrílicos livres (cisteína) não reagem. Vapores de HCl intensificam o fundo róseo (Toennies & Kolb, 1951).

Revelação com ninhidrina

Compostos como aminoácidos, aminas e aminoaçúcares podem ser revelados pela reação com ninhidrina. O reagente é borrifado nas placas e a posição dos aminoácidos visualizada na forma de manchas róseas sobre um fundo branco. A coloração pode ser intensificada pelo aquecimento da placa a 90° C por alguns minutos (Bieleski & Turner, 1966).

6.1.3.3 -Precipitação de proteínas do Extrato Bruto com ácido tricloroacético a 5%

A adição de ácido tricloroacético (TCA) tem sido usada para precipitar proteínas e separá-las de substâncias nitrogenadas não-protéicas (Lucas et al., 1988).

Com o objetivo de avaliar a contaminação do E.B por proteínas de elevado peso molecular, co-extraídas com os peptídeos e aminoácidos livres, procedeu-se a precipitação das mesmas com TCA numa concentração final de 5%. Após a adição do TCA a suspensão foi mantida em repouso por 1 hora e, em seguida, centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos.

No precipitado determinou-se o teor de nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1984).

6.1.3.4 -Hidrólise ácida dos peptídeos

Com a finalidade de determinar os aminoácidos constituintes dos peptídeos presentes no E.B e nos extratos purificados submeteu-se as amostras a uma hidrólise com HCl 6,0 N a 110° C em ampolas seladas à vácuo, de acordo com o procedimento originalmente descrito por Moore (1963). A hidrólise foi realizada por tempos variáveis e posteriormente padronizado para 3 horas. Este tempo é suficiente, pois os peptídeos são mais lábeis à hidrólise do que as proteínas (Zacharius et al., 1959).

O HCl foi removido em dessecador à vácuo contendo pastilhas de NaOH e o resíduo seco ressuspendido em água ou em tampão citrato Na-S (Beckman), segundo a análise a ser realizada posteriormente, e a amostra filtrada por membrana com poros de 0,22 μ .

6.2 - Biológicos

6.2.1 - Germinação das sementes

Visando a avaliação do comportamento do (s) peptídeo (s) γ -glutamil sulfurados (s) durante a germinação de sementes de feijão, foi realizado um ensaio de germinação, basicamente de acordo com o procedimento descrito por Wu & Wall (1980).

As sementes de feijão foram divididas em 18 grupos : grupos de 1 a 9, cada um com 100 sementes, e grupos de 10 a 18, com 50 sementes em cada grupo. As sementes de cada grupo foram pesadas e, em seguida, lavadas com cerca de duas vezes o seu volume em água destilada (100 ml e 50 ml, respectivamente) Posteriormente, as sementes foram colocadas de molho em solução de formaldeído a 0,2% por 30 min., para desinfecção, e assim evitar o crescimento de fungos durante a germinação. As sementes foram novamente lavadas por várias

vezes com água destilada para a remoção do formaldeído e colocadas de molho em água destilada por mais 20 min. Logo após, a água foi removida e as sementes de cada grupo foram colocadas para germinar em placas de Petri com papel de filtro umedecido: 20 ml de água destilada para os grupos de 100 sementes e 8 ml para os de 50 sementes.

O ensaio foi efetuado durante 5 dias à temperatura ambiente (27-29° C) e à luz natural.

A cada dia, e durante os 5 dias, as sementes dos grupos 10 a 14, que continham 50 sementes, foram secas em estufa a 105°C até peso constante, e analisadas quanto ao seu conteúdo em proteína pelo método de micro-Kjeldahl descrito no item 6.3.1.

As sementes dos grupos 1 a 5 foram utilizadas para a obtenção dos respectivos extratos nitrogenados não-protéicos (E.B), dos vários dias de germinação, de forma semelhante à das sementes não germinadas (Figura 1).

Interrompeu-se o ensaio da germinação a partir do 5º. dia, devido a elevada temperatura ambiente, que acelerou demasiadamente o processo de germinação.

6.3 - Analíticos

6.3.1 -Determinação de nitrogênio total

A determinação de nitrogênio total foi efetuada através do método de micro-Kjeldahl (AOAC,1984) e o nitrogênio convertido para proteína, quando conveniente, por multiplicação pelo fator 6,25. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

6.3.2 - Determinação de umidade

Na determinação de umidade da amostra foi empregado o método da dessecação em estufa a 105° C (IAL, 1985). O processo é gravimétrico e está baseado na determinação da perda de peso da amostra submetida a aquecimento em estufa a 105° C.

6.3.3 - Determinação de açúcares totais

Na determinação de açúcares totais foi empregado o método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Este método baseia-se no fato do fenol, na presença de ácido sulfúrico, poder ser usado para determinação microcolorimétrica quantitativa de açúcares e seus metil derivados, oligossacarídeos e polissacarídeos pois os açúcares com grupos redutores livres, ou potencialmente livres, reagem com o fenol em meio ácido dando cor amarelo-laranja. Todas as análises foram realizadas em triplicata e utilizou-se para o cálculo, uma curva padrão de D-manose na concentração de 0,1 mg/ml .

6.3.4 - Análise de aminoácidos com ninhidrina

Na análise de aminoácidos com ninhidrina foi empregado o método descrito por Holt & Sosulski, 1981.

A determinação colorimétrica de aminoácidos com ninhidrina baseia-se na formação de cor azul pela reação da ninhidrina com compostos tendo grupos amina livres. Utilizou-se na curva padrão a L-leucina nas concentrações de 0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM e 2,0 mM e os resultados (análises em triplicata) foram expressos em μ moles de α -aminoácidos na amostra.

6.3.5 - Composição em aminoácidos

Os aminoácidos presentes no E.B., nas frações purificadas Amberlite e Dowex, bem como em seus hidrolisados, foram identificados por cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos Beckman, modelo 7300 (Beckman Instruments, CA). O equipamento trabalha com coluna única de sódio de 20 cm de comprimento, 3 tampões eluentes, além do reagente de regeneração da coluna e reagente de ninhidrina, todos produzidos pela Beckman. A reação dos aminoácidos com a ninhidrina ocorre pós-coluna, sendo a intensidade de cor medida em colorímetro em 570 e 440 nm. As áreas dos picos do aminograma das amostras são integradas e comparadas as áreas dos picos de uma mistura padrão de aminoácidos em integrador Hewlett Packard.

Todas as amostras foram ressuspensas ou diluídas em tampão citrato Na-S para volumes que permitissem que a concentração de cada uma estivesse de acordo com a sensibilidade do equipamento (100 nmoles de cada aminoácido /ml).

6.3.6 - Oxidação da S-metilcisteína padrão com ácido perfórmico

O desconhecimento do tempo de eluição da S-metilcisteína na sua forma oxidada, na análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica em autoanalisador, nos levou a realizar a oxidação da S-metilcisteína e submetê-la a análise. A oxidação foi feita com ácido perfórmico, de acordo com as recomendações descritas por Spindler et al. (1984). Pelo fato da nossa amostra não ser uma proteína, tornou-se necessário calcular a proporção entre o teor de grupos tiometila e ácido perfórmico na proteína e calcular a quantidade de ácido perfórmico necessária para oxidar a elevada quantidade de grupos tiometila presentes no E.B. Utilizamos a proporção de 0,004 mmoles de -S-CH₃ para 5 ml de ácido perfórmico.

7.-RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 -Extração e obtenção do Extrato Bruto

Inicialmente são apresentados os resultados referentes à extração da fração nitrogenada não-protéica do feijão e os diversos passos para o isolamento de peptídeos sulfurados (γ -glutamil-S-metilcisteína e γ -glutamil metionina). Seguiram-se ensaios para comprovar a sua identidade e para estimar a sua quantidade nas sementes. Os γ -glutamil peptídeos pertencem à fração nitrogenada não-protéica de leguminosas e podem ser extraídos com água, com soluções etanólicas ou metanólicas. Foram estudados e adaptados inicialmente os procedimentos para a extração e o isolamento dos peptídeos sulfurados presentes no feijão e, dentre os vários métodos descritos para a extração de diversos vegetais, especialmente bulbos de alho e cebola, selecionado o método descrito por Kasai et al. (1986) por terem trabalhado também com sementes de leguminosas.

Foi adaptado e otimizado o processo de extração com etanol a 70% para as nossas condições, empregando-se pequenas quantidades (50g) de farinha repetidas vezes, e apresentando os resultados relativos a extração, como sendo a média das diversas repetições. Os citados autores realizaram a extração a partir de 3 kg de semente.

O teor médio de proteína no feijão estudado foi de 24,58g% ($\pm 0,15$), valor semelhante ao encontrado por Sgarbieri e Galeazzi (1990) de 25,72%, para sementes da mesma variedade cultivadas em outra época e em local diferente.

A farinha de feijão, extraída com etanol nas condições descritas, forneceu um resíduo seco com um teor de proteínas de 23,73%. Considerando a perda de massa durante a extração, calculamos uma remoção de 20,61% da proteína

originalmente existente no feijão. Expressando estes valores em nitrogênio, para evitar o uso de um fator inadequado de conversão para proteína, a concentração de nitrogênio no feijão corresponde a 3,93% e no resíduo da extração a 3,80%. Estes valores correspondem a uma extração de 21,2% do nitrogênio total existente no feijão.

A extração da farinha de feijão com etanol a 70% resultou num extrato rico em açúcares solúveis, extraídos juntamente com a fração nitrogenada, representada principalmente por aminoácidos livres e peptídeos. O extrato etanólico contém também elevado teor de proteínas co-extraídas pelo etanol a 70%. A lavagem com clorofórmio removeu estas proteínas, sendo o extrato resultante denominado daqui por diante de Extrato Bruto (E.B.).

Com a finalidade de conhecer melhor a composição do E.B. foi determinado o teor de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl. O E.B. apresentou um teor de 0,1074 g nitrogênio/ 100 ml de extrato, o que corresponde a 0,67 g de proteína/ 100 ml de extrato. Pelo fato do E.B. conter principalmente aminoácidos livres e compostos nitrogenados de baixo peso molecular (<10.000), tais como peptídeos e talvez outras substâncias nitrogenadas, arbitrariamente chamadas de nitrogênio não-protéico, todos os resultados foram expressos em teor de nitrogênio.

Em termos percentuais, o teor de nitrogênio total no E.B., corresponde a 5,46% do total de nitrogênio existente no feijão. Os demais 15,74% restantes, provavelmente proteínas co-extraídas, haviam sido removidos durante a lavagem do extrato etanólico com clorofórmio, como veremos mais adiante. Zacharius (1970) encontrou um teor de 7,54% de nitrogênio não-protéico no feijão pelo método de Kjeldahl.

7.2 -Caracterização do Extrato Bruto

Com o objetivo de avaliar a contaminação do E.B. por proteínas, foram realizados testes adicionando ácido tricloroacético (TCA) ao E.B., visando a precipitação de proteínas eventualmente ainda presentes.

A adição de ácido tricloroacético ao Extrato Bruto, numa concentração final de 5%, resultou num pequeníssimo precipitado. A determinação de nitrogênio neste precipitado, pelo método de Kjeldahl, forneceu um teor total de 0,72 mg de nitrogênio /100 ml de E.B., o que significa que apenas 0,65% do nitrogênio presente no E.B. encontram-se numa forma precipitável com TCA. Estes resultados vem confirmar que a fração nitrogenada do E.B. é constituída quase que exclusivamente de aminoácidos e/ou peptídeos de baixo peso molecular. Desta forma, consideramos bastante eficiente a purificação do extrato etanólico inicial pelo clorofórmio, e salientamos a importância deste passo, para a remoção de proteínas co-extraídas.

O teor de α -aminogrupos livres no E.B., determinado pelo método da ninhidrina, corresponde a valores da ordem de 2.236 μ moles eq. de leucina (= 293,3 mg) /100 ml de E.B e de 4.411 μ moles (=578,7 mg) /100 ml para o E.B hidrolisado. O aumento de 97% no E.B. hidrolisado, representando praticamente o dobro do encontrado no E.B., pode ser explicado pela presença de peptídeos no E.B., nos quais os aminogrupos estão comprometidos em ligações peptídicas e, portanto, não disponíveis para a reação com a ninhidrina. A hidrólise do E.B. aproxima os valores entre o teor de equivalentes de leucina, pelo método da ninhidrina, aos valores calculados a partir da determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. O teor de nitrogênio total no E.B., determinado pelo método de Kjeldahl e calculado como equivalentes de leucina, é da ordem de 5.114,5 μ moles /100 ml de E.B.

O E.B. contém um elevado teor de carboidratos solúveis, como já dissemos anteriormente, extraídos do feijão juntamente com a fração nitrogenada. A determinação quantitativa destes carboidratos através da reação H_2SO_4 - Fenol forneceu um teor de 1,43 g equivalentes de manose / 100 ml do E.B. Estes 100 ml foram obtidos a partir de 50 g de feijão. Portanto, foram extraídos 2,86 g de açúcares a partir de 100 g de feijão. Reddy et al. (1984) encontraram para o feijão um teor de 6,7% de açúcares solúveis totais, correspondente aos oligossacarídeos sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose. Pelo fato dos açúcares representarem em nosso trabalho apenas substâncias contaminantes, não foi estudada a sua identidade. No entanto, o elevado teor de açúcares dificulta a obtenção do E.B. na sua forma liofilizada, pois o mesmo se torna muito higroscópico.

7.3 - Isolamento de peptídeos sulfurados

A purificação do E.B., visando a obtenção dos γ -glutamil peptídeos sulfurados, livres de contaminantes de origem glicídica ou aminoacídica, foi efetuada pela sucessiva passagem do E.B. por colunas de troca catiônica e aniônica.

Os aminoácidos livres e os peptídeos foram adsorvidos inicialmente em resina de troca catiônica, fortemente ácida (Amberlite IR-120). A coluna contendo a resina foi lavada com água para remover compostos neutros, principalmente carboidratos, e os aminoácidos e peptídeos eluídos com NH_4OH 2,0 M. Uma segunda purificação foi feita pela adsorção dos aminoácidos e peptídeos em resina de troca aniônica, fortemente básica (Dowex-1). A lavagem desta coluna com água removeu os aminoácidos neutros e básicos, sendo os aminoácidos e peptídeos ácidos recuperados pela eluição com ácido acético (HAc). A terceira purificação,

utilizando a mesma resina anterior, tinha por objetivo separar os aminoácidos e peptídeos ácidos entre si, através da eluição com um gradiente de concentração de ácido acético.

A escolha da resina e do eluente apropriados depende das características de carga elétrica do aminoácido ou peptídeo que se deseja isolar, ou seja do pK_1 (NH_3^+) para resinas básicas e do pK_2 (COO^-) para resinas ácidas. A γ -glutamil-S-metilcisteína pode ser isolada dos demais aminoácidos por cromatografia em resinas fortemente básicas, na forma de acetato ou formato, e eluição com ácido acético. A ordem de eluição, nestas condições é dependente do valor de pK correspondente à mudança da carga do aminoácido de zero para -1. Para aminoácidos e dipeptídeos contendo ácido glutâmico e um aminoácido neutro, corresponde ao pK_2 . Embora não esteja definido o valor de pK_2 para todos os γ -glutamil peptídeos, assume-se ser inferior ao do ácido glutâmico (4,31) e do ácido aspártico (3,90), e superior ao do segundo aminoácido, com um valor aproximado de 3,7 (Kasai & Larsen, 1980). Assim, a γ -glutamil-S-metilcisteína deverá ser eluída pelo ácido acético após o ácido glutâmico e o ácido aspártico.

7.3.1 -Primeira purificação (resina de troca catiônica)

A primeira purificação do E.B., realizada em coluna de troca catiônica (Amberlite IR-120), a partir da aplicação de 5 ml de E.B. na coluna, teve por objetivo a remoção de compostos neutros presentes na amostra (principalmente carboidratos) através da lavagem da coluna com 300 ml de água, coletando-se três frações : uma fração de 200 ml e duas de 50 ml cada. Em seguida, a fração nitrogenada foi obtida pela eluição com NH_4OH 2,0 M, coletando-se 350 ml em 7 frações de 50 ml cada. Todas as frações foram liofilizadas e ressuspendidas para

os volumes especificados no item 6.1.3.1. Nestas frações foram determinados os teores de aminoácidos e carboidratos totais, e realizada uma análise da composição por cromatografia em camada delgada, cujos resultados passaremos a descrever.

7.3.1.1 -Determinação de aminoácidos totais

A determinação de aminoácidos totais no eluato Amberlite apresentou, nas 7 frações NH_4OH 2,0 M coletadas, os seguintes resultados pelo método da ninhidrina (Tabela 1).

TABELA 1. Teor de aminoácidos no Extrato Bruto e no eluato Amberlite

AMOSTRA	<u>Equivalentes de Leucina</u>		
	μmoles	mg	% de Recuperação
E.B (5 ml)	111,80	14,67	100,0
<u>Eluato Amberlite:</u>			
1a. fração	3,83	0,50	3,0
2a. fração	96,38	12,63	86,0
3a. fração	9,31	1,18	8,0
4a. fração	3,16	0,39	3,0
5a. fração	1,98	0,25	2,0
6a. fração	1,12	0,14	1,0
7a. fração	0,91	0,12	0,8
TOTAL	116,69	15,21	103,8

De acordo com os resultados acima, a soma dos aminoácidos recuperados nas 7 frações corresponde aproximadamente a quantidade total de aminoácidos aplicados na coluna, evidenciando-se não ter havido perda de aminoácidos pela passagem do E.B. na coluna.

Também pode-se observar que aproximadamente 86% dos aminoácidos foram recuperados na fração 2.

O branco obtido da reação da ninhidrina com o NH_4OH 2,0 M, utilizado na eluição da resina de troca catiônica e cuja absorbância foi usada para corrigir os valores de absorbância dos eluatos acima, forneceu um valor médio de absorbância de 0,0023 ($=0,0006103 \mu\text{moles eq. leucina / 50 } \mu\text{l do eluente } \text{NH}_4\text{OH}$ 2,0 M).

7.3.1.2 -Determinação de carboidratos

A purificação do E.B. através da passagem do mesmo por uma coluna contendo resina de troca catiônica (Amberlite IR-120) para remoção de compostos neutros, especialmente carboidratos, foi monitorada visando a obtenção dos peptídeos γ -glutamil isentos de carboidratos. Determinou-se o teor de carboidratos totais na água de lavagem da resina iônica.

A análise da água de lavagem da resina Amberlite após aplicação do E.B., mostrou que nas três frações coletas houve a remoção de praticamente todos os carboidratos presentes no E.B., conforme demonstra a Tabela 2.

TABELA 2. Teor de carboidratos totais no Extrato Bruto e na água de lavagem da resina Amberlite

AMOSTRA	Carboidratos (g eq. de manose / 100 ml E.B)	% de Recuperação
E.B	1,43 ($\pm$ 0,12)	100,0
<u>Eluato com Água :</u>		
1a. fração	1,29 ($\pm$ 0,15)	90,2 - 100,0
2a. fração	traços	~ 0,3
3a. fração	traços	

7.3.1.3 -Cromatografia em camada delgada (CCD) do Extrato Bruto e dos eluatos da resina Amberlite

Os aminoácidos livres e os peptídeos presentes no E.B. e no eluato Amberlite, bem como em seus hidrolisados ácidos, foram cromatografados em camada delgada em placa de sílica gel , revelados com ninhidrina e iodoplatinato (Bieleski & Turner, 1966) e estudados mediante comparação com padrões de L-aminoácidos descritos no item 6.1.3.2. Os valores de R_f s obtidos encontram-se na Tabela 3.

No primeiro ensaio , utilizando como fase móvel n-Butanol-Ácido Acético-Água (4:1:2) e revelação ninhidrina, o Extrato Bruto e o eluato Amberlite, 2a. fração, mostraram um perfil semelhante entre si e um n° de no mínimo 7 manchas difusas. Num segundo ensaio testamos outra proporção dos solventes da fase móvel (4:1:1), que resultou no mesmo número de manchas, mas proporcionando uma separação melhor, que passamos a adotar daqui por diante.

TABELA 3. Cromatografia em camada delgada do Extrato Bruto, da 2a. fração do eluato Amberlite e de aminoácidos padrão, com os respectivos Rf's :

PADRÕES	Rf
<u>Aminoácido Padrão (Revelação Ninhidrina) :</u>	
Metionina	0,46
Metionina-sulfóxido	0,16
Cisteína	0,36
S-Metilcisteína	0,40
Ácido glutâmico	0,35
Ácido aspártico	0,40
Leucina	0,51
<u>E.B e eluato Amberlite 2° Fração (Revelação Ninhidrina) :</u>	
1° mancha	0,47
2° mancha	0,40
3° mancha	0,37
4° mancha	0,24
5° mancha	0,15
6° mancha	0,09
<u>E.B e eluato Amberlite 2° Fração (Revelação Iodoplatinato) :</u>	
1° mancha	0,32
2° mancha	0,24
3°mancha	0,21

1. Placa de sílica gel 2. Fase móvel : n-Butanol-Ácido Acético- Água (proporção 4:1:1 v/v/v)

Comparando os cromatogramas do E.B. e da 2a. fração Amberlite concluímos que a passagem do E.B. pela resina de troca iônica para remover compostos neutros, especialmente os carboidratos, não modificou o perfil e o número de manchas na cromatografia em camada delgada, comprovando mais uma vez não ter havido perdas de aminoácido pela cromatografia em resina Amberlite.

O cromatograma do E.B., revelado com ninhidrina, mostrou uma mancha com $R_f = 0,40$, tentativamente identificada como sendo ácido aspártico ou S-metilcisteína. Outras duas manchas apresentaram R_f s semelhantes à metionina (0,47) e da cisteína (0,37), respectivamente, além de uma quarta mancha, parecendo ser sulfóxido de metionina ($R_f = 0,15$). As demais manchas não puderam ser identificadas. Uma destas manchas, bastante grande e difusa, apresentou um R_f médio de 0,24 (0,22 a 0,26).

Na tentativa de identificar aminoácidos ou peptídeos sulfurados no E.B. e nas frações do eluato Amberlite revelamos a placa com o reagente de iodoplatinato de potássio, específico para substâncias que contenham enxofre na forma reduzida. O reagente iodoplatinato reage com compostos sulfurados como a metionina e a S-metilcisteína, que aparecem como manchas brancas sobre um fundo róseo. Enxofre na forma de dissulfeto (-S-S-) e de grupos sulfidrílicos livres (-SH), como no caso da cistina e da cisteína, respectivamente, ou na forma oxidada (sulfóxido e sulfona de metionina, ácido cistéico) não reagem.

O E.B. e a 2a. fração do eluato Amberlite mostraram a presença de 3 manchas positivas na revelação com o iodoplatinato com R_f s de 0,32; 0,24 e 0,21. A 3a. fração apresentou apenas uma mancha de $R_f = 0,24$. As manchas de $R_f = 0,24$ coincidem com a mancha grande que havia sido evidenciada com ninhidrina e que talvez possam representar a γ -glutamil-S-metilcisteína e/ou a γ -glutamil metionina) procurados, mas para os quais ainda não possuímos os padrões sintéticos correspondentes, pois os mesmos não são comercializados.

A mancha que na revelação ninhidrina parecia ser metionina ($R_f = 0,47$), não foi revelada com iodoplatinado e, portanto, não parece existir metionina livre no

E.B. ou está presente em pequena concentração. As outras duas manchas (R_f s 0,32 e 0,21) não foram identificadas na revelação com iodoplatinado.

A presença de S-metilcisteína livre no E.B. também não foi detectada. Uma possível explicação é a sua presença em baixas concentrações na amostra estudada.

Para confirmar a hipótese de que a mancha com $R_f=0,24$ revelada com ninhidrina correspondia a um peptídeo sulfurado, hidrolisamos o E.B. com HCl 6,0 N por 3 h a 110° C. A mancha grande desaparecia após este tratamento, havendo um deslocamento para um R_f um pouco superior correspondente ao padrão de ácido glutâmico ($R_f=0,35$) e o aparecimento de uma mancha mais intensa do que do E.B. não hidrolisado, correspondente a S-metilcisteína ou ao ácido aspártico.

A revelação com iodoplatinato confirmou a mancha com $R_f=0,40$, que aparecia após a hidrólise, corresponder à S-metilcisteína embora a presença concomitante do ácido aspártico não pudesse ser descartada. Não foi evidenciada no cromatograma a liberação de metionina após a hidrólise do E.B., sugerindo que a mancha com $R_f=0,24$ correspondia apenas a um peptídeo contendo ácido glutâmico e S-metilcisteína.

Assim, nas concentrações empregadas, não foi possível evidenciar a presença de γ -glutamil metionina.

Pela hidrólise ácida o número de manchas tanto no E.B. quanto no eluato Amberlite 2a. fração aumentou para no mínimo 10 na revelação com ninhidrina, sendo indicativo da presença de outros peptídeos no E.B. e no eluato Amberlite.

Para ilustrar melhor nossos resultados, apresentamos a reprodução de uma fotografia de dois cromatogramas (Figura 3).

FIGURA 3. Cromatografia em camada delgada unidimensional do Extrato Bruto, Extrato Bruto hidrolisado e dos padrões de L-aminoácidos. (A) Revelação ninhidrina e (B) revelação iodoplatinato de potássio

1 - Extrato Bruto
 2 - Extrato Bruto hidrolisado
 3 - L-metionina
 4 - L-metionina-sulfóxido
 5 - L-cisteína

6 - S-metil-L-cisteína
 7 - Ácido L-glutâmico
 8 - Ácido L-aspartico
 9 - L-leucina

De acordo com os resultados até aqui obtidos, a mancha de maior intensidade, de $R_f = 0,24$, corresponde a nosso ver a γ -glutamil-S-metilcisteína, suposição que pretendemos confirmar nos testes seguintes. Zacharius et al. (1959) observaram na cromatografia em papel que o peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína apresentava $R_f = 0,18$ e a S-metilcisteína de $0,27$, utilizando como fase móvel o n-Butanol-Ácido Acético-Água na proporção de 9:1:2,5. Esta fase móvel é menos polar do que a utilizada por nós, o que pode explicar o menor valor do R_f do peptídeo encontrado por estes autores.

7.3.2 -Segunda purificação (resina de troca aniônica)

A 2a. e a 3a. frações Amberlite foram reunidas, liofilizadas, ressuspensas em água (20 ml) e, posteriormente, uma alíquota de 5 ml ($=26,42 \mu\text{moles}$) foi empregada em uma nova purificação, desta vez por uma coluna contendo resina de troca aniônica (Dowex 1). Esta segunda purificação do E.B. teve por objetivo a remoção dos aminoácidos básicos e neutros através da lavagem da coluna com 125 ml de água, coletando-se quatro frações : uma fração de 50 ml e três de 25 ml cada. O peptídeo procurado comporta-se como aminoácido ácido, sendo eluído de acordo com o seu pK_2 . Presume-se que o pK_2 para um γ -glutamil peptídeo corresponda ao pK médio dos aminoácidos constituintes sendo próximo aos pK s do ácido glutâmico e ácido aspártico (Kasai & Larsen, 1980). Assim, os aminoácidos ácidos foram eluídos com ácido acético (HAc) 2,0 M, coletando-se cinco frações : uma fração de 50 ml e quatro de 25 ml cada. Todas as frações foram liofilizadas e ressuspensas conforme especificado no item 6.1.3.1, para serem estudadas quanto ao teor em aminoácidos e comportamento na cromatografia em camada delgada.

7.3.2.1 -Determinação de aminoácidos totais

A determinação de aminoácidos totais no eluato Dowex apresentou nas quatro frações com água e nas cinco frações HAc 2,0 M coletadas, os seguintes resultados pelo método da ninhidrina (Tabela 4).

De acordo com os resultados acima, a soma dos aminoácidos recuperados corresponde aproximadamente a quantidade total de aminoácidos aplicados na resina Dowex (3,41 mg eq. de leucina/ 5 ml da fração Amberlite).

Pode-se observar também, que a lavagem da resina Dowex com água removeu a maior parte dos aminoácidos presentes na amostra (aproximadamente 61%), correspondendo aos aminoácidos neutros e básicos. Os demais aminoácidos da amostra (45,7%) são aminoácidos ácidos, obtidos pela eluição com HAc 2,0 M . O peptídeo procurado também encontra-se na fração dos aminoácidos ácidos.

7.3.2.2 -Cromatografia em camada delgada dos eluatos da resina Dowex

Ensaio de CCD foram efetuados para acompanhar a purificação destas frações.

Os eluatos Dowex com ácido acético foram reunidos novamente, liofilizados e ressuspensos em água (3 ml). Os aminoácidos livres e peptídeos presentes foram novamente cromatografados em camada delgada em placa de sílica gel e revelados com ninhidrina e iodoplatino. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

TABELA 4. Teor de aminoácidos totais na água de lavagem da resina Dowex e nos eluatos com ácido acético 2,0 M :

AMOSTRA	<u>Equivalentes de leucina</u>		% de Recuperação
	μ moles	mg	
Eluato Amberlite (5 ml)	26,42	3,41	100,0
<u>Eluato com água :</u>			
1a. fração	15,00	1,97	57,0
2a. fração	0,55	0,08	2,0
3a. fração	0,42	0,05	1,5
4a. fração	0,21	0,03	0,8
Subtotal	16,18	2,13	61,3
<u>Eluato Dowex:</u>			
1a. fração	4,00	0,52	15,4
2a. fração	4,50	0,59	17,3
3a. fração	2,00	0,26	7,7
4a. fração	1,00	0,13	3,8
5a. fração	0,43	0,05	1,5
Subtotal	11,93	1,55	45,7
TOTAL	28,11	3,68	107,0

TABELA 5. Cromatografia em camada delgada do eluato Dowex e os respectivos Rfs :

AMOSTRA	Rf
<u>Eluato Dowex (Revelação ninhidrina) :</u>	
1° mancha	0,38
2° mancha	0,29
3° mancha	0,26
4° mancha	0,24
<u>Eluato Dowex (Revelação iodoplatinato) :</u>	
1° mancha	0,38
2° mancha	0,24

1. Placa de sílica gel

2. Fase móvel : n-Butanol-Ácido acético-Água (proporção 4:1:1, v/v/v)

O eluato Dowex apresentou 4 manchas na revelação com ninhidrina. Uma superior correspondendo aparentemente a S-metilcisteína ($R_f = 0,38$) ou ao ácido aspártico ($R_f=0,40$) e três manchas próximas entre si na posição do possível peptídeo com Rfs de 0,29 ; 0,26 e 0,24, respectivamente. Na concentração do eluato utilizado não apareceu a metionina. O ácido aspártico é descrito na literatura como sendo contaminante durante a purificação (Zacharius et al., 1959). A revelação do eluato Dowex com iodoplatinato de potássio apresentou duas manchas. Uma com $R_f = 0,38$, correspondendo a S-metilcisteína, e a outra na posição do peptídeo com $R_f = 0,24$. Durante a realização dos inúmeros cromatogramas, verificamos uma ligeira variação no valor dos Rfs, como pode ser observado comparando-se os números apresentados.

Estes resultados indicam ter havido uma purificação da γ -glutamil-S-metilcisteína pela passagem na Dowex-1, com a remoção dos aminoácidos básicos e neutros.

Os eluatos com a água de lavagem da resina Dowex apresentaram reação negativa quando reveladas com iodoplatinato de potássio.

O eluato Dowex foi submetido a uma nova purificação na coluna contendo a mesma resina de troca aniônica (Dowex-1), através de uma eluição com gradiente de concentração de ácido acético entre 0,2 e 2,0 M, para melhor separação.

7.3.3 - Terceira purificação com gradiente de concentração de HAc (resina de troca aniônica)

A terceira purificação do E.B. teve por objetivo o isolamento do peptídeo procurado, separando-o dos demais aminoácidos ácidos, especialmente do ácido aspártico, contaminante de difícil remoção, como comentado anteriormente.

Todos os eluatos Dowex (2a. purificação) foram reunidos e reaplicados na coluna contendo resina aniônica (Dowex-1). Em seguida, a fração aminoácidos ácidos foi separada através da eluição com gradiente de ácido acético, coletando-se quatro frações de 50 ml cada, num total de 125 ml para cada concentração (0,2; 0,5 ; 1,0 e 2,0 M). Todas as amostras coletadas foram liofilizadas e ressuspendidas conforme descrito em 6.1.3.1, e estudadas quanto a sua composição em aminoácidos.

7.4 - Acompanhamento da purificação pela análise de aminoácidos em autoanalisador

A purificação do peptídeo pela cromatografia de troca iônica, a eluição dos aminoácidos e o ajuste dos volumes de cada fração eluída, foram inicialmente monitorados pela cromatografia em camada delgada, por uma questão de custo. Uma vez otimizadas as condições de purificação, avaliamos todo o processo de

purificação pela análise de aminoácidos em autoanalisador, que passaremos a descrever.

A análise de aminoácidos do E.B. mostrou um perfil bastante complexo, contendo todos os aminoácidos normalmente presentes em proteínas naturais, embora em pequenas quantidades. Predominam no E.B. os aminoácidos ácidos- ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu)- tendo aparecido ainda um pico muito grande, com um tempo de eluição próximo ao do ácido aspártico, mas que não foi identificado nesta etapa do trabalho. De acordo com dados da literatura, poderia corresponder ao peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína (Zacharius et al., 1959). Outro pico, com tempo de eluição semelhante ao da prolina, foi identificado como S-metilcisteína, por comparação com padrão e diferenciação da prolina pela medida espectrofotométrica diferencial em 570 e 440 nm. Os aminogramas do E.B. medidos em 440 nm evidenciaram uma quantidade desprezível de prolina (Figura não apresentada).

7.4.1- Purificação por resina de troca catiônica (Amberlite IR-120)

A primeira purificação do E.B. por resina de troca catiônica (Amberlite IR-120) e eluição com NH_4OH descrita anteriormente, resultou, como esperávamos, num perfil de aminoácidos semelhante ao do E.B., com cerca de 17 picos de aminoácidos protéicos. Na Figura 4 apresentamos o aminograma do E.B. e, comparativamente, do eluato Amberlite.

Para elucidar a identidade do pico não identificado, que apresentava um tempo de retenção próximo ao do ácido aspártico, hidrolisamos o eluato Amberlite com HCl 6,0 N e repetimos a análise de aminoácidos. (Figura 5). O aminograma confirmou a nossa hipótese: o pico desconhecido desapareceu e pode ser observado um aumento da área do pico do ácido glutâmico e da S-metilcisteína,

FIGURA 4. Aminograma típico do Extrato Bruto e da 2a. fração do eluato em Amberlite

FIGURA 5. Aminograma da 2a. fração do eluato em Amberlite, antes e após a hidrólise ácida

resultantes da hidrólise do peptídeo. Na mesma figura verificamos também um aumento da área do pico da leucina, decorrente da hidrólise de possíveis outros peptídeos, como por ex. a γ -glutamil leucina, cuja presença em feijões tem sido descrita na literatura (Zacharius, 1970). Houve pequeno aumento da área do pico da metionina, o que nos leva a crer o feijão estudado possuir em quantidades muito pequenas, um outro peptídeo sulfurado, a γ -glutamil metionina. Este peptídeo, juntamente com a γ -glutamil leucina, foram detectados por análise elementar em sementes de feijão, por Morris et al. (1963) tendo sido, no entanto, a quantidade insuficiente para um isolamento. Zacharius, em 1970, verificou que a γ -glutamil metionina estava presente em sementes de *Phaseolus vulgaris* numa quantidade aproximadamente vinte e duas vezes inferior a da γ -glutamil-S-metilcisteína, tendo chegado a este resultado realizando a extração de 4,5 kg de semente. Estes resultados justificam não termos detectado γ -glutamil metionina em nossas análises.

É interessante observar que em alguns vegetais há predominância da γ -glutamil metionina em relação a γ -glutamil-S-metilcisteína, como por exemplo nas sementes de *Vigna mungo*, que podem ser diferenciadas das sementes de *Vigna radiata* com base no seu perfil em γ -glutamil sulfurados (Kasai et al., 1986). Embora a presença deste peptídeo tenha sido descrita com maior frequência em leguminosas, a família *Alliaceae* também o contém (Virtanen & Matikkala, 1959; Fenwick & Hanley, 1985).

7.4.2 - Purificação por resina de troca aniônica (Dowex 1)

O conjunto de frações resultantes da purificação anterior (resina de troca catiônica Amberlite IR-120) foi agora aplicado numa coluna contendo resina de troca aniônica (Dowex 1) e acompanhada também pela análise de aminoácidos. A

lavagem desta resina com água, confirmou a remoção praticamente completa de todos os aminoácidos neutros e básicos, como pode ser observado na Figura 6. Os aminoácidos ácidos, incluindo a γ -glutamil-S-metilcisteína foram eluídos da coluna pela passagem de HAc 2,0 M, embora não tenha sido possível separar estes aminoácidos entre si nas diversas frações coletadas nesta etapa da purificação (Figura 7). A eluição destes, ocorreu em diferentes proporções nas quatro frações coletadas. A separação dos aminoácidos entre si, foi possível por uma segunda purificação por resina de troca aniônica (Dowex 1), sendo a eluição feita com concentrações crescentes de ácido acético, como veremos.

7.4.3- Purificação por resina de troca aniônica (Dowex 1) com gradiente de HAc

Na Figura 8 (A-C) são mostrados os aminogramas correspondentes a purificação do peptídeo através da cromatografia em coluna contendo resina Dowex, e eluição dos aminoácidos com um gradiente de ácido acético 0,2 M até 2,0 M.

A eluição com ácido acético na menor concentração removeu praticamente todos os aminoácidos neutros ainda presentes, bem como uma pequena quantidade do peptídeo e de S-metilcisteína livre (Figuras não apresentadas).

O aumento da concentração do ácido acético para 0,5 M removeu principalmente o ácido glutâmico, além de alguns outros aminoácidos e pequenos picos não identificados, como pode ser observado na Figura 8(A). Nota-se que a 3a. fração já possui uma concentração reduzida de ácido glutâmico, e ocorrendo o início da eluição do ácido aspártico. A remoção deste aminoácido se completa no início da eluição com HAC 1,0 M que ainda remove quantidades residuais do ácido

FIGURA 6. Aminograma do eluato com água, 2a. purificação, em resina de troca aniônica (Dowex-1)

Figura 7. Aminograma da 1a. fração (A), 2a. fração (B), 3a. fração (C) e 4a. fração (D) do eluato Dowex, 2a. purificação, e eluição com ácido acético 2 M

FIGURA 8 (A). Aminograma do eluato Dowex, 3a. purificação, e eluição com ácido acético 0,5 M

glutâmico e parte do peptídeo. A eluição com HAc 1,0 M pode ser acompanhada na Figura 8(B).

O peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína, que até este ponto havia sido parcialmente recuperado, foi eluído com HAc 2,0 M, praticamente livre de outros aminoácidos contaminantes (Figura 8 (C)).

Ainda podem ser observados no aminograma pequenos picos, com tempo de eluição inferiores a 4 minutos (ácido cistéico = 1,99 min.), correspondentes provavelmente a formas oxidadas da S-metilcisteína livre ou ligada, fato que deverá ser comprovado em ensaios futuros.

O peptídeo purificado por este procedimento deverá ser submetido no futuro a uma identificação conclusiva, além de sua quantificação direta por comparação com o peptídeo sintético, cuja obtenção se encontra em fase de purificação. A identidade será concluída por análise elementar, espectrometria de massa e espectrometria no infra-vermelho.

7.5 - Hidrólise ácida do Extrato Bruto

Um dos objetivos do trabalho consistia na determinação quantitativa do peptídeo sulfurado presente no feijão.

Esta medida pode ser realizada utilizando o autoanalisador de aminoácidos, HPLC ou mesmo a recente eletroforese capilar, desde que se tenha um padrão apropriado, de pureza conhecida. Pelo fato do γ -glutamil peptídeo em questão não ser comercialmente disponível, nós nos propusemos a sintetizá-lo em laboratório em colaboração com o Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. A síntese desse padrão ainda não foi concluída pois, enquanto a síntese de muitos

FIGURA 8 (B). Aminograma do eluato Dowex 3a. purificação, e eluição com ácido acético 1,0 M.

FIGURA 8 (C). Aminograma do eluato Dowex, 3a. purificação, e eluição com ácido acético
2,0 M

peptídeos ocorre sem maiores problemas, a síntese de peptídeos sulfurados pode ser considerada "problemática" e se encontra em fase de purificação.

Embora ainda não tenhamos efetuado a quantificação da γ -glutamil-S-metilcisteína presente no feijão pela medida direta, por comparação com o padrão sintético, realizamos alternativamente uma quantificação a partir do doseamento da S-metilcisteína total, após hidrólise ácida do E.B. do feijão. Apesar desta metodologia não ser a mais adequada, pelo fato da hidrólise ácida provocar perdas além de uma possível oxidação da S-metilcisteína para o seu sulfóxido, ou outras formas de oxidação ainda não completamente conhecidas, foi a forma que encontramos para estimar o teor de S-metilcisteína no feijão.

7.5.1 - Estudo do tempo de hidrólise

Inicialmente estudamos o tempo de hidrólise do E.B. uma vez que o período de 22 horas a 110° C, empregado por Zacharius (1970) foi considerado excessivo para γ -glutamil peptídeos, fato observado por Kristensen et al.(1974).

Testamos tempos de 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas de hidrólise, conforme descrito em 6.1.3.4, e observamos que a liberação e recuperação de S-metilcisteína era máxima após 3 horas de hidrólise, decaindo em tempos superiores. Paralelamente, acompanhamos também a liberação do ácido glutâmico. Observamos que a concentração deste aminoácido manteve-se praticamente constante durante os vários tempos de hidrólise testados. Estes resultados estão apresentados na Figura 9. Observamos também a quantidade recuperada da metionina, da leucina e do ácido aspártico após os vários tempos de hidrólise. Estes aminoácidos mantiveram-se estáveis durante hidrólises entre 3 e 4 horas. Não foi observado nenhum aminoácido cuja recuperação tivesse sido superior a encontrada após 3

FIGURA 9. Efeito do tempo de hidrólise do Extrato Bruto sobre a recuperação de alguns aminoácidos

horas de hidrólise. Com base nestes resultados, padronizamos o tempo de hidrólise nas análises subsequentes para 3 horas.

7.5.2 - Liberação de aminoácidos pela hidrólise

Com o intuito de verificar a existência de outros γ -glutamil peptídeos no E.B., procuramos visualizar nos aminogramas o aumento da concentração dos aminoácidos, causada pela hidrólise de 3 horas.

Entre os dezessete aminoácidos identificados no E.B. observamos um aumento principalmente do ácido glutâmico e da S-metilcisteína, como pode ser observado na Tabela 6. Foi verificado também um pequeno aumento da leucina (116 μ moles /100g de feijão) e da metionina (40 μ moles /100g de feijão).

O aumento da concentração destes dois últimos aminoácidos após a hidrólise apóia a hipótese da existência de peptídeos contendo metionina e leucina.

7.6 - Quantificação da S-metilcisteína total presente no feijão

Analizando agora o aumento de ácido glutâmico e S-metilcisteína no E.B. e no E.B. hidrolisado, observamos um aumento de 1.024 μ moles de S-metilcisteína e um aumento de 1.637 μ moles de ácido glutâmico /100g de feijão. O aumento de ácido glutâmico foi 60% superior ao da S-metilcisteína, sugerindo haver peptídeos contendo ácido glutâmico e S-metilcisteína (1:1) e peptídeos contendo ácido glutâmico e outros aminoácidos (γ -glutamil leucina, γ -glutamil metionina). A presença de tripeptídeos, γ -glutamil- γ -glutamil-S-metilcisteína, semelhantes aos encontrados na *Vigna radiata* por Kasai et al. (1986), não pode ser excluída.

Uma outra explicação para o aumento do ácido aspártico após a hidrólise, seria parte dele estar embutida no pico do γ -glutamil-S-metilcisteína antes da

hidrólise mas ser completamente quantificado após a hidrólise, uma vez que a quantificação do ácido aspártico o E.B. pode estar prejudicada pela proximidade dos picos do ácido aspártico e da γ -glutamil-S-metilcisteína.

TABELA 6. Teor de aminoácidos no Extrato Bruto e no Extrato Bruto hidrolisado por 3 horas a 110°C

Aminoácidos	E.B	E.B hidrolisado (3 horas) $\mu\text{moles}/100\text{g}$ feijão	Aumento Expresso em μmoles
Ácido aspártico	428	1.082	654
Treonina	103	44	-59
Serina	259	64	-195
Ácido glutâmico	819	2.456	1.637
S-metilcisteína/Prolina	188	1.212	1.024
Glicina	34	86	52
Alanina	87	132	45
Valina	48	76	28
Metionina	17	57	40
Isoleucina	14	55	41
Leucina	21	137	116
Fenilalanina	53	79	26
Histidina	44	74	30
Lisina	13	61	48
Triptofano	205	190	-15
Arginina	325	463	138

Desta forma, os resultados aqui encontrados estão de acordo com a classificação químico-taxonomica descrita por Kasai et al. (1975) para leguminosas, onde diversos gêneros *Phaseolus*, incluindo a espécie *P. vulgaris*, pertencem ao segundo grupo de sementes, ou seja, contendo concentrações muito baixas ou nulas de γ -glutamil fenilalanina e γ -glutamil tirosina, mas elevadas concentrações de outros γ -glutamil peptídeos.

Assim, a quantificação do peptídeo pela medida da liberação do ácido glutâmico, não se mostrou um parâmetro adequado. Passamos, então, a realizar a quantificação do peptídeo pela medida da S-metilcisteína.

O teor total de S-metilcisteína encontrado a partir de uma amostra hidrolisada por 3 horas foi de 0,67g /100g de proteína do feijão. Expressando este valor para a semente integral, corresponde a 0,16g /100 g de feijão.

Evans & Boulter (1975) encontraram em sementes de *Phaseolus vulgaris* um teor de 0,87 g de S-metilcisteína /100 g de proteína, maior teor entre diversas leguminosas estudadas. Anteriormente, Zacharius (1970) já chamava a atenção para o elevado teor deste peptídeo no feijão, 11,5 μ M /g de semente. Fazendo as devidas conversões, o valor encontrado por nós corresponde a 12,1 μ M /g de semente.

O teor de S-metilcisteína livre presente no E.B não hidrolisado, foi pequeno, da ordem de 0,10g /100g de proteína.

O teor de S-metilcisteína encontrado em nossos estudos, da ordem de 0,7% da proteína do feijão, representa uma quantidade muito elevada, considerando que a concentração de metionina em feijões da espécie *Phaseolus* situa-se ao redor de

1,4% na proteína (Koehler & Burkhe, 1988; Rayas-Duarte et al., 1988; Peace et al., 1988; Marletta et al., 1992).

Em sementes nacionais o teor em metionina, encontrado por diversos autores e utilizando metodologias analíticas várias, situa-se entre 0,4 e 1,73% na proteína (Costa de Oliveira et al., 1987; Durigan et al., 1987; Tezoto & Sgarbieri, 1990; Sgarbieri & Galeazzi, 1990; Lanfer Marquez et al., in press).

Estes dados são coerentes com informações da literatura, que indicam que os dipeptídeos e seus aminoácidos sulfurados constituintes representarem até 50% dos aminoácidos sulfurados presentes em feijões (Evans & Boulter, 1975; Otoul et al., 1975; Wu et al., 1982).

O procedimento para a análise quantitativa da metionina envolve frequentemente uma hidrólise ácida, precedida de oxidação com ácido perbórico, e a análise por cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos.

No entanto, este método não distingue o estado de oxidação da metionina, uma vez que a metionina é analisada na forma química de sulfona de metionina.

A metionina total, determinada por cromatografia de troca iônica na forma de sulfona de metionina, pode não estar disponível para utilização pelo organismo animal. Este fato, aliado a dificuldade encontrada em avaliar a disponibilidade da metionina por ensaios com animais, tem motivado os pesquisadores para o desenvolvimento de ensaios "in vitro", que pudessem dar informações sobre o teor de metionina não oxidada, corrigido pela digestibilidade para enfim avaliar a qualidade protéica (Sarwar & Mc Donough, 1990; FAO /WHO, 1991).

A reação da metionina com brometo de cianogênio (BrCN), formando quantidades estequiométricas de metiltiocianato (MeSCN), quantificado por

cromatografia em fase gasosa, tem sido o método frequentemente utilizado para determinar o teor de metionina quimicamente disponível em feijões (Ellinger & Duncan, 1976; McIntosh & Ellinger, 1976; Duncan et al., 1984; Kohnhorst et al., 1990).

No Brasil, o método tem sido empregado por Durigan e seus colaboradores e, recentemente, por Lanfer Marquez et al. (in press).

Uma análise dos resultados encontrados neste trabalho realizado em nosso laboratório revelou que 7 variedades de feijão apresentaram um teor semelhante ou menor de metionina total do que de metionina a forma reduzida, determinada pelo método da clivagem com brometo de cianogênio. Neste trabalho os autores apresentaram a hipótese dos valores estimados para a “metionina biodisponível” estar superestimada devida a presença de substâncias interferentes, capazes de liberarem também metiltiocianato.

Concluindo, o método da reação com BrCN, frequentemente empregado para determinar a quantidade de metionina biodisponível, não parece ser um método adequado para vegetais, especialmente leguminosas, que contém γ -glutamil-S-metilcisteína.

Neste sentido, há necessidade de trabalhos futuros fornecendo o teor de γ -glutamil-S-metilcisteína em outras leguminosas, pois alguns outros gêneros não parecem possuí-lo, ou apresentam apenas pequenas quantidades. Sob o ponto de vista nutricional, a importância da γ -glutamil-S-metilcisteína ainda é fonte de especulação.

7.7- Comportamento da γ -glutamil-S-metilcisteína durante a germinação da semente do feijão

A maioria dos γ -glutamil peptídeos é sintetizada e acumulada nas sementes durante a germinação. Em vegetais do gênero *Allium*, o acúmulo ocorre nos tecidos (Kasai & Larsen, 1980) e a atividade da enzima γ -glutamil transpeptidase tem sido responsabilizada pela sua síntese (Thompson et al., 1964). No entanto, mais recentemente atribui-se a esta enzima uma ação de degradação do peptídeo, verificada durante a germinação das sementes de leguminosas (Kasai et al., 1982) ou bulbos (Fenwick & Hanley, 1985; Ceci et al., 1992).

Em bulbos de alho a germinação foi acompanhada de um decréscimo de γ -glutamil peptídeos e um aumento da γ -glutamil transpeptidase (GTP). Esta enzima catalisa a transferência do grupo γ -glutamil do peptídeo para outros aminoácidos e peptídeos em vegetais, microrganismos e tecidos de mamíferos. A γ -glutamil transpeptidase encontrada em microrganismos e em tecidos de mamíferos está ligada a membrana celular no transporte de peptídeos através da membrana (Nissen, 1974; Poole, 1976). Em vegetais, a função da γ -glutamil transpeptidase não parece ser a mesma. Em bulbos de alho, a enzima foi encontrada durante a germinação, sugerindo uma função durante a ativação do sistema metabólico respiratório. Tem sido descrita como sendo a primeira enzima envolvida com a degradação de γ -glutamil peptídeos (Ceci et al., 1992). Ocorre também ativação desta enzima durante um stress celular (Meister & Tate, 1976).

Levando em consideração estas observações, realizamos um ensaio de germinação de sementes de feijão com o objetivo de avaliar o comportamento da γ -glutamil-S-metilcisteína. O ensaio foi efetuado durante 5 dias, analisando a cada dia o nitrogênio total e o conteúdo em aminoácidos de extratos brutos obtidos de forma semelhante a das sementes não germinadas.

Os resultados referentes ao conteúdo de proteína nas sementes germinadas encontram-se na Tabela 7.

Durante os 5 dias houve uma perda de peso das sementes de cerca de 12%, enquanto o teor de proteína teve um acréscimo de 19,6%. Em termos absolutos, ocorreu um pequeno aumento da quantidade de proteína nas sementes, da ordem de 7,6%, possivelmente causada pela germinação à luz do dia.

Com relação ao comportamento da γ -glutamil-S-metilcisteína, pela análise de aminoácidos no E.B. das sementes germinadas, observamos um decréscimo do peptídeo durante os dias de germinação (Figuras 10 e 11). Aparentemente ocorreu uma mobilização e degradação do peptídeo sem, no entanto, haver aumento paralelo da S-metilcisteína livre, que seria o produto da hidrólise do peptídeo. Da mesma forma, não foi observado um aumento significativo do ácido glutâmico, indicando ocorrer metabolização dos aminoácidos que compõem o peptídeo.

Foi descrita em alho irradiado e armazenado, uma metabolização da γ -glutamil-S-metilcisteína, iniciada pela γ -glutamil-S-metil transpeptidase, liberando precursores para a allinase, enzima responsável pela formação de flavor (Ceci et al., 1992).

Figura 10. Aminograma do Extrato Bruto das sementes germinadas 1o. dia (A), 2o. dia (B) e 3o. dia (C)

Figura 11. Aminograma do Extrato Bruto das sementes germinadas 40. dia (D) e 50. dia (E)

TABELA 7. Conteúdo de proteína nas sementes germinadas

Germinação	Proteína (N x 6,25) (% em peso seco)	Peso da semente seca (g) 50 sementes
Não germinadas	26,07	9,58
1o. dia	27,30	9,55
2o. dia	27,44	9,86
3o. dia	27,59	9,36
4o. dia	28,78	9,26
5o. dia	29,90	8,44

8. CONCLUSÕES

1) Os γ -glutamil peptídeos sulfurados presentes no feijão (*P. vulgaris* L.) pertencem à fração nitrogenada não-protéica e podem ser extraídos com solução etanólica a 70%. A extração etanólica removeu aproximadamente 21% do nitrogênio total existente no feijão, sendo que destes 5,5% pertencem a fração nitrogenada não-protéica e os 15,7% restantes à proteínas co-extraídas. A lavagem do extrato etanólico com clorofórmio removeu estas proteínas.

2) A fração nitrogenada não-protéica (Extrato Bruto) é constituída de aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular, não precipitáveis com ácido tricloroacético a 5%, contendo também elevado teor de carboidratos solúveis.

3) Os procedimentos de purificação, adaptados para nossas condições, foram adequados para o isolamento da γ -glutamil-S-metilcisteína isenta das demais substâncias presentes na fração nitrogenada não-protéica.

4) O conteúdo em aminoácidos da fração não-protéica (Extrato Bruto) apresenta na análise de aminoácidos um perfil complexo com todos os aminoácidos protéicos, além da presença de 8 picos não identificados.

5) Foi identificada no Extrato Bruto elevada quantidade de γ -glutamil-S-metilcisteína, ainda não quantificada pela medida direta por comparação com padrão sintético autêntico. A síntese deste padrão se encontra em fase de purificação. Foi identificada a presença de S-metilcisteína livre presente numa concentração pequena, da ordem de 0,1g /100g de proteína do feijão.

6) Nas condições empregadas não foi possível evidenciar a presença de γ -glutamil metionina. Porém, os resultados obtidos pela análise de aminoácidos em autoanalisador levam a crer que o feijão estudado possui este peptídeo em quantidades muito pequenas.

7) A concentração do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína foi determinada após hidrólise ácida e quantificação da S-metilcisteína liberada. Foi encontrado um teor de 0,67g de S-metilcisteína /100g de proteína do feijão. A S-metilcisteína total (0,67g), descontada da S-metilcisteína livre (0,10g) corresponde a S-metilcisteína liberada do peptídeo durante a hidrólise. Portanto, o peptídeo contribui com 85% da S-metilcisteína encontrada.

8) A quantificação da γ -glutamil-S-metilcisteína, pela determinação do ácido glutâmico também liberado pela hidrólise ácida, não foi considerado método adequado devido a possível presença de outros peptídeos contendo ácido glutâmico como, por exemplo, a γ -glutamil leucina e γ -glutamil metionina.

9) O estudo do tempo de hidrólise (HCl 6,0 N) mostrou que a liberação da S-metilcisteína a partir do peptídeo é máxima após 3 horas de hidrólise, decaindo em tempos superiores. Também não foi observado nenhum outro aminoácido cuja recuperação tivesse sido superior a encontrada após 3 horas de hidrólise.

10) Considerando um teor de metionina total em feijões ao redor de 1,4% na proteína e um teor de S-metilcisteína total da ordem de 0,7%, concluímos que a presença deste aminoácido e do seu peptídeo com o ácido glutâmico superestima em aproximadamente 50% o teor de metionina disponível determinada pelo método do BrCN.

11) Tomando ainda como referência um teor médio de 1,6% de equivalentes de metionina (MeSCN) encontrados por Lanfer Marquez et al. (in press) e descontados 0,7% correspondente à interferência pela S-metilcisteína, resulta um teor de 0,9% de metionina disponível na proteína, valor que corresponde por sua vez a 64% da metionina total presente no feijão.

12) Os resultados encontrados estão de acordo com a classificação químio-taxonomica descrita por Kasai et al. para leguminosas, onde diversas variedades de feijões sob o gênero *Phaseolus*, incluindo o *P. vulgaris*, pertencem ao grupo de sementes contendo concentrações muito baixas ou nula de γ -glutamil fenilalanina e γ -glutamil tirosina, mas elevadas concentrações de outros γ -glutamil peptídeos.

13) O estudo do comportamento da γ -glutamil-S-metilcisteína no E.B. das sementes germinadas mostrou um decréscimo do peptídeo durante os dias de germinação, aparentemente devido a uma mobilização e degradação do mesmo sem, no entanto, haver aumento paralelo da S-metilcisteína livre e do ácido glutâmico, indicando ocorrer metabolização dos aminoácidos que compõem o peptídeo.

9- RESUMO

Foi estudada a fração não-protéica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), tendo por objetivo identificar a presença e conhecer o teor de γ -glutamil peptídeos sulfurados. Estes peptídeos (γ -glutamil-S-metilcisteína e γ -glutamil metionina) podem interferir com o doseamento da metionina pelo método da clivagem com brometo de cianogênio e análise do metiltiocianato por cromatografia em fase gasosa. O extrato etanólico contém 21% do nitrogênio total do feijão. A lavagem do extrato com clorofórmio reduziu o teor de nitrogênio para 5,5%, pela remoção de proteínas co-extraídas. O extrato não-proteico assim obtido foi purificado sucessivamente por resinas de troca catiônica e aniônica, ocorrendo a separação dos constituintes pelos seus valores de pK. A purificação foi acompanhada por testes químicos, cromatografia em camada delgada e análise de aminoácidos. Foi identificada com base nas suas características químicas, a presença de S-metilcisteína, principalmente na forma de dipeptídeo com ácido glutâmico. A quantificação do peptídeo após hidrólise ácida (3h / 110° C), resultou num teor de S-metilcisteína total de 0,67g /100g proteína, que corresponde a aproximadamente 50% do teor de metionina no feijão, determinado por cromatografia de troca iônica. Estes resultados podem indicar que o teor de metiltiocianato total, liberado pela metionina e pela S-metilcisteína do feijão (1,6%) (determinado em trabalho anterior), descontado do teor de S-metilcisteína (0,7%), equivale à metionina quimicamente disponível, correspondendo a aproximadamente 64% da metionina total presente no feijão. No ensaio de germinação das sementes do feijão foi observado um decréscimo da γ -glutamil-S-metilcisteína, indicando uma mobilização dos aminoácidos constituintes.

9- SUMMARY

The non-protein fraction of *Phaseolus vulgaris* L. seeds has been analysed to obtain information on the identity and level of γ -glutamyl peptides containing a sulfur amino acid. These peptides (γ -glutamyl-S-methylcysteine and γ -glutamyl methionine) could interfere with the determination of methionine measured by cleavage with cyanogen bromide and subsequent gas-chromatographic identification of methylthiocyanate. The ethanolic extract of γ -glutamyl peptides contains 21% of the total seed nitrogen, which decrease to 5,5%, by removing the coextracted bean proteins with chloroform. This non-protein extract was then purified by ion-exchange chromatography on basic and acid resins, taking advantage of the different pK values of the amino acids. The isolation procedure was followed up by chemical analysis, thin layer chromatography and amino acid analysis. Based on their chemical properties we were able to identify the presence of S-methylcysteine, mainly in the form of a dipeptide with glutamic acid. Quantitative analysis of the peptide after acid hydrolysis (3h /110° C) showed a level of 0,67g /total S-methylcysteine /100gbean protein. This content accounted for approximately 50% of the bean methionine content, determined by ion-exchange chromatography. These results might indicate that total methylthiocyanate released from both, methionine and S-methylcysteine of beans, (1,6%) (from a previous paper) subtracted from S-methylcysteine (0,7%) could be recognized as chemically available methionine, corresponding to approximately 64% of total methionine. During seed germination the γ -glutamyl-S-methylcysteine undergo a degradative process resulting in loss of the dipeptide.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- ANTUNES, P. L. , SGARBIERI, V. C. - Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 28, p. 935-8, 1980.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. - *Official methods of analysis*, 14. ed., Washington, 1984. p.927-8.
- BENEVENGA, N. J. - Toxicities of methionine and other amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 22, p. 2-9, 1974.
- BENEVENGA, N. J. , YEH, M. H. , LALICH, J. J. - Growth depression and tissue reaction to the consupcion of excess dietary methionine and S-metil-L-cysteine. *J. Nutr.*, v. 106, p. 1714-20, 1976.
- BIELESKI, R. L. , TURNER, N. A. - Separation and estimation of amino acids crude extrats by thin layer eletrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 17, p. 278-83, 1966.

* De acordo com a NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1990.

- CANNIATTI-BRAVACA, S. G. , MANCINI FILHO, J. , LAM-SANCHEZ, A. -
Melhoramento genético da qualidade nutricional de alimentos vegetais. II-
Leguminosas: controle genético de fatores antinutricionais e de carotenóides.
Cadernos de Nutrição, v. 6, p. 44-61, 1993.
- CECI, L. N. , CURZIO, O. A. , PONILIO, A. B. - Effects of irradiation and storage
on the γ -glutamyl transpeptidase activity of garlic bulbs cv "Red". *J. Sci.*
Food Agric., London, v. 59, p. 505-10, 1992.
- CHIN, H. W. , LINDSAY, R. C. - Mechanisms of formation of volatile compounds
following the action of cysteine sulfoxide lyases. *J. Agr. Food Chem.*,
Washington, v.42, p. 1529-36, 1994.
- COSTA DE OLIVEIRA, A. C. , SAWAZAKI, H. E. , GALEAZZI, M. A. M.- Extração,
caracterização parcial e aspectos nutricionais das proteínas do feijão Carioca
80. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, Guatemala, v. 37, p. 88-100, 1987.
- DARDENNE, G. A. , THONART, P., OTOUL, E. , MARECHAL, R. - Étude
chimiotaxonomique dans les genres **Macrolyloma**, **Dolichos** et
Pseudovigna. *Phytochemistry*, Oxford, v.12, p. 1983-92, 1973.
- DAY, R. J. , BOROWY, D. E. , SCHISLA, R. M. - Analysis of the free acid of
methionine hidroxy analogue in supplemented feeds. *J. Agric. Food Chem.*,
Washington, v. 31, p. 889-91, 1983.
- DOU, L. , KRULL, I. S. - Determination of aromatic and sulfur-containing amino
acids, peptides and proteins using high-performance liquid chromatography
with photolytic electrochemical detection. *Anal. Chem.*, Washington, v. 62,
p. 2599-606, 1990.

- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A ., SMITH, F. -
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Anal. Chem., Washington, v. 28, p. 350-6, 1956.
- DUNCAN, A. , ELLINGER, T. M. , GLENNIE, R. T. - Determination of methionine
by gas-liquid chromatography : modifications in its application to legumes
and cereals. *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 35, p. 381-4, 1984.
- DURIGAN, J. F. , SGARBIERI, V. C. , BULISANI, E. A. - Protein value of dry bean
cultivars : factors interfering with biological utilization. *J. Agric. Food Chem.*,
Washington, v. 35, p. 694-8, 1987.
- ELLINGER, G. M. , DUNCAN, A. - The determination of methionine in proteins by
gas-liquid chromatography. *Biochem. J.*, v. 155, p. 615-21, 1976.
- EVANS, I. M. , BOULTER, D. - S-methylcysteine content of various legumes meals.
Qual. Plant. Plant. Foods. Hum. Nutr., The Hague, v. 24, p. 257-61, 1975.
- EVANS, R. J. , BAUER, D. H. - Studies of the poor utilization by the rat of
methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). *J.*
Agric. Food Chem., Washington, v. 26, p. 779-84, 1978.
- EVANS, R. J. , BAUER, D. H. , SISAK, K. A. , RYAN, P. A. - The availability for the
rat of methionine and cysteine in dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric.*
Food Chem., Washington, v. 22, p. 130-33, 1974.
- EYRE, M. D. , PHILLIPS, D. E. , EVANS, I. M. , TOMPSON, A. - The nutritional
role of S-methyl-L-cysteine. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.34, p. 696-
700, 1983.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - Protein quality evaluation. *FAO Nutr. Rep. Ser.* , Rome, nº 51, 1991.
- FENWICK, G. R. , HANLEY, A. B. - The genus *Allium*. Part 2. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Cleveland, v. 22, p. 273-377, 1985.
- FRIEDMAN, M. , GUMBMAN, M. R. - The utilization and safety of isomeric sulfur-containing amino acids mice. *J. Nutr.*, v. 114, p.2301-10, 1984.
- GENOVESE, M. I. , LAJOLO, F. M. - Utilization of the colorimetric method of McCarthy & Sullivan for the determination of bioavailable methionine in bean proteins (*Phaseolus vulgaris* L.). *Arq. Biol. Tecnol.*, São Paulo, v. 36, p. 545-66, 1993.
- GOORE, M. Y. , THOMPSON, J. F. - γ -Glutamyl transpeptidase from kidney bean fruit. I. Purification and mechanism of action. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 132, p. 15-26, 1967.
- HERRICK, H. F. , LAWRENCE, J. M. , COAHARAN, D. R. - Simple method for determination of methionine and cysteine in legumes seeds. *Anal. Biochem.*, v. 48, p. 353-64, 1972.
- HOLT, N. W. , SOSULSKI, F. W. - Nonprotein nitrogen contents of some grain legumes. *Can. J. Plant Sci.*, Ottawa, v. 61, p. 515-23, 1981.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 3. ed., São Paulo, 1985, v. 1.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - Nomenclature of α -amino acids. *Biochemistry*, v. 14, p. 449, 1975.

- KASAI, T. , SANO, M. , SAKAMURA, S. - Amino acid composition of broad bean (*Vicia faba*). I. Pattern of acidic amino acid fraction. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, v. 49, p. 313-459, 1975.
- KASAI, T. , LARSEN, P. O. - Chemistry and biochemistry of γ -glutamyl derivatives from plants including mushrooms (basidiomycetes). *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, Vienna, v. 39, p. 175-285, 1980.
- KASAI, T., OHMIYA, A. , SAKAMURA, S. - γ -Glutamyl transpeptidases in the metabolism of γ -glutamyl peptides in plants. *Phytochemistry*, Oxford, v. 21, p. 1233-9, 1982.
- KASAI, T., SHIROSHITA, Y. , SAKAMURA, S. - γ -Glutamyl peptides of *Vigna radiata* seeds. *Phytochemistry*, Oxford, v. 25, p. 679-82, 1986.
- KOEHLER, H. H. , BURKHE, D. W. - Nutrient and sensory properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under various cultural conditions. *J. Food Sci.*, v. 53, p. 1135-8, 1988.
- KRISTENSEN, I. , LARSEN, P. O. , SORENSEN, H. - Free amino acids and γ -glutamyl peptides in seeds of *Fagus silvatica*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 13, p. 2803-11, 1974.
- KOHNHORST, A. L. , SMITH, D. M. , UEBERSAX, M. A. , BENNINK, M. R. - Compositional, nutritional and functional properties of meals, flours and concentrates from navy and kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Quality*, v. 13, p. 435-46, 1990.

- LAM-SANCHEZ, A. - Melhoramento de leguminosas visando a qualidade nutricional. In: Salgado, J. M. - Interface, Nutrição x Agricultura, Piracicaba, s. ed., 1989. p. 57-82.
- LANCASTER, J. E. , KELLY, K. E. - Quantitative analysis of the S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides in onion (*Allium cepa* L.). *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 34, p. 1229-35, 1983.
- LANCASTER, J. E. , SHAW, M. L. - Metabolism of γ -glutamyl peptides during development storage and sprouting of onion bulbs. *Phytochemistry*, Oxford, v. 30, p. 2857-9, 1991.
- LUCAS, B., GUERRERO, A., SIGALES, L. , SOTELO, A. - True protein content and non-protein amino acids present in legumes seeds. *Nutr. Rep. Int.*, v. 37, p. 545-53, 1988.
- LUNDER, T. L. - An improved method for the colorimetric determination of methionine in acid hydrolysates of biological products. *Ind. Aliment.*, v. 12, p. 94-100, 1973.
- MARLETTA, L. , CARBONARO, M. , CARNOVALE, E. - In-vitro protein and sulphur amino acid availability as a measure of bean protein quality. *J. Sci Food Agric.*, London, v. 59, p. 497-504, 1992.
- McCARTHY, T. E. , SULLIVAN, M. X. - A new and highly specific colorimetric test for methionine. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 141, p. 871-6, 1941.
- McINTOSH, A. , ELLINGER, G. M. - Determination of methionine in the seeds of legumes. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 35, p. 148- , 1976.

- MEISTER, A. , TATE, S. S. - Glutathione and related γ -glutamyl compounds : biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 45, p. 559-604, 1976.
- MOORE, S. - On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 238, p. 235-7, 1963.
- MORRIS, C. J. , THOMPSON, J. F. ASEN, S. IRREVERRE, F. The isolation of γ -L-glutamyl- β -alanine from Iris bulbs. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 237, p. 2180-1, 1962.
- MORRIS, C. J., THOMPSON, J. F. , ZACHARIUS, R. M. - The identification of γ -L-glutamyl-L-leucine and γ -L-glutamyl-L-methionine in kidney bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 238, p. 650-2, 1963.
- MUTSCH-ECKNER, M., MEIER, B., WRIGHT, A. D. , STICHER, O. - γ -Glutamyl peptides from *Allium sativum* bulbs. *Phytochemistry*, Oxford, v. 31, p. 2389-91, 1992.
- NIGAM, S. N , TU, J. , McCONNEL, W. B. - Distribution of selenomethylseleno cysteine and some other amino acids in species of Astragalus, with special reference to their distribution during the growth of *A. bisulcatus*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 8, p. 1161-5, 1969.
- NISSEN, P. - Uptake mechanism inorganic and organic. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v. 25, p. 53, 1974.
- OTOUL, F. , MARECHAL, R. , DARDENNE, G. , DESMEDT, F. - Des dipeptides soufres differentient nettement *Vigna radiata* de *Vigna mungo*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 14, p. 173-9, 1975.

- PARTRIDGE, S. M. , WESTALL, R. G. - Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. *Biochem. J.*, v. 44, p. 418-28, 1949.
- PEACE, R. W. , KEITH, M. O. , SARWAR, G. , BOTTING, H. G. - Effects of storage on protein nutritional quality of grain legumes. *J. Food Sci.*, v. 53, p. 439-41, 1988.
- POOLE, R. J. - Transport in cells of storage tissue. Transport in plants II. Part A. Cells. *Encyclopaedia of Plant Physiology*, New York, v. 2A, p. 229, 1976.
- RAYAS-DUARTE, P. , SATTERLEE, L. O., ROMERO, A. L. - Enzymatic release of peptides, methionine and cystine from dry beans following various heat treatments. *J. Food Sci.*, v. 53, p. 468- 72, 1988.
- REEDY, N. R., PIERSON, M. D., SATHE, S. K. , SALUNKHE, D. K. - Chemical nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates - A review. *Food Chem.*, Barking, v. 13, p. 25-68, 1984.
- RINDERKNECHT, H. D. , THOMAS, D. , ASLIN, S. - γ -Glutamyl-S-methyl-cystein und andere peptide in der Mondbohne (*Phaseolus lunatus* L.). *Helv. Chem. Acta*, v. 41, p. 1-11, 1958.
- SARWAR, G. S. , McDONOUGH, F. E. - Review of protein quality evaluation methods. Evaluation of protein digestibility-corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v. 73, p. 347-56, 1990.
- SCHWIMMER, S. - S-Allyl-L-cysteine sulfoxide lyase [*Allium cepa* (onion)]. *Methods Enzymol.*, v. 17B, p. 475, 1971.

- SGARBIERI, V. C. , ANTUNES, P. L. , ALMEIDA, L. D. - Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.*, v. 44, p. 1306-8, 1979.
- SGARBIERI, V. C. , GALEAZZI, M. A. M. - Quantifications and some chemical and biochemical characterization of nitrogenous substances from varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *J. Food Biochem.*, v. 14, p. 233-47, 1990.
- SHAW, M. L. , LANCASTER, J. E. , LANE, G. A. - Quantitative analysis of the major γ -glutamyl peptides in onion bulbs (*Allium cepa*). *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 49, p. 549-67, 1989.
- SPINDLER, M., STADLER, R. , TANNER, H. - Amino acid analysis of feedstuffs: Determination of methionine and cystine after oxidation with performic acid and hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 32, p. 1366-71, 1984.
- TANNENBAUM, S. R. , BARTH, H. , LE ROUX, J. P. - Loss of methionine in casein during storage with autoxidizing methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 17, p. 1353-54, 1969.
- TEZOTO, S. S. , SGARBIERI, V. C. - Protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 38, p. 1152-6, 1987.
- THOMPSON, J. F. , MORRIS, C. J. , ARNOLD, W. N. , TURNER, D. H. - γ -Glutamyl peptides in plants. Amino acid pools. Elsevier Press, Amsterdam, 1962. p. 1-54.

- THOMPSON, J. F. , MORRIS, C. J. , ZACHARIUS, R. M. - Isolation of S-methyl-L-cysteine from beans (*Phaseolus vulgaris*). *Nature*, v. 178, p. 593, 1956.
- THOMPSON, J. F., TURNER, D. H. , GERING, R. K. - γ -Glutamyl transpeptidase in plants. *Phytochemistry*, Oxford, v. 3, p. 33-46, 1964.
- TOBIN, G. , CARPENTER, K. J. - The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*) : a literature review. *Nutr. Abs. Rev.*, v. 48, p. 918-36, 1978.
- TOENNIES, G. , KOLB, J. J. - Techniques and reagents for paper chromatography. *Anal. Chem.*, Washington, v. 23, p.823-6, 1951.
- TSOU, S. C. S. , HSU, M. S. , TAN, S. T. , PARK, H. G. - . The protein quality of mungbean and its improvement. *Acta Horticulture*, v. 93, p. 279-87, 1979.
- VIRTANEN, A. I, MATIKKALA, E. J. - The isolation of S-methyl-cysteinesulphoxide and S-n-propylcysteinesulphoxide from onion (*Allium cepa*) and the antibiotic activity of crushed onion. *Acta Chem. Scand.*, Copenhagen, v. 13, p. 1898-1900, 1959.
- WALEY, S. G. - Naturally occurring peptides. *Advan. Protein Chem.*, v. 21, p. 1- , 1966.
- WATANABE, T. , TSUGAWA, M. , TAKAYAMA, N. , TURUKAWA, Y. - Changes of free amino acids of each organ in the development and growth of the kidney bean plant. *Hokkaido Daigaku Kiyo.*, v. 22B, p. 45-50, 1971.
- WU, S. H. , WANG, K. T. , TSOU, S. C. S. - Analysis of γ -glutamyl dipeptides in bean extracts by high performance liquid chromatography. *Proc. Natl. Sci. Council. ROC(A)*, v. 6, p. 34-8, 1982.

WU, Y. V. , WALL, J. S. - Lysine content of protein increased by germination of normal and high-L-lysine sorghum. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 28, p. 455-8, 1980.

ZACHARIUS, R. M. - Composition of the nitrogenous components of the bush bean seed (*Phaseolus vulgaris*) including isolation of δ -acetylornithine. *Phytochemistry*, Oxford, v. 9, p. 2047-51, 1970.

ZACHARIUS, R. M., MORRIS, C. J. , THOMPSON, J. F. - The isolation and characterization of γ -L-glutamyl-S-methyl-L-cysteine from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophysics*, New York, v. 80, p. 199-209, 1959.