



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Gabriela Barbosa Rossi

**Comparação do Proteoma e Capacidade Antioxidante Antes e Após Digestão *in vitro* de
Grãos de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Florianópolis

2020

Gabriela Barbosa Rossi

Comparação do Proteoma e Capacidade Antioxidante Antes e Após Digestão *in vitro* de Grãos de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rossi, Gabriela Barbosa
Comparação do Proteoma e Capacidade Antioxidante Antes e
Após Digestão in vitro de Grãos de Feijão (*Phaseolus
vulgaris* L.) / Gabriela Barbosa Rossi ; orientadora, Ana
Carolina Maisonnave Arisi, 2020.
124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Feijão comum. 3.
Proteômica. 4. Capacidade Antioxidante. I. Maisonnave
Arisi, Ana Carolina. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Gabriela Barbosa Rossi

Comparação do Proteoma e Capacidade Antioxidante Antes e Após Digestão *in vitro* de Grãos de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Thais de Souza Rocha, Dra.
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Rosete Pescador, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que essa é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciência dos Alimentos

Prof^a. Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^a. Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado a base de tudo, meus filhos
Caio e Caetano, marido Clionce, meus pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos, Caio e Caetano que ainda estão na barriga, mas me deram força para terminar essa importante etapa da minha vida profissional.

Ao meu marido Clionce de Oliveira Marques Neto por sempre manter os meus pés no chão, por nunca me deixar desistir e por todo apoio, esforço e paciência da graduação até aqui.

Aos meus pais e irmão pela dedicação, amor e esforços voltados para ensinar todos os valores que trago comigo.

À minha orientadora, Profa Dra Ana Carolina Maisonnave Arisi pela oportunidade de aprendizado desde a graduação, pela excelente orientação e pela gentileza durante a minha gravidez.

Ao grupo do laboratório de Biologia Molecular, ICs, Mestrandos, Doutorandos e Pós-Doutorandos com quem dividi por muito tempo a maior parte dos meus dias, aprendendo, trocando experiências, rindo, chorando, enfim, por sempre estarem dispostos a ajudar de alguma forma. Sou muito grata por ter conhecido pessoas extraordinárias como vocês e vou levar comigo as lembranças boas de cada um. Aprendi muito com todos!

Aos amigos queridos Carla Pawlowskii, Pedro Alexandre Valentim Neto, Diana Treml, Vanessa Poletto, Pâmela Dall Asta, Jéssica Bueno, Kelly Anacleto e Kelly Justin. Vocês são pessoas muito especiais na minha vida!

À querida e amada Mirella, comigo desde a graduação no laboratório, compartilhando alegrias, angústias, ansiedades, êxitos, etc. Terminamos a graduação juntas, entramos no mestrado juntas, fizemos a progressão juntas e chegamos até aqui juntas! Muito obrigada por me entender, me ajudar, por ser essa titia coruja dos gêmeos, enfim, por ser essa pessoa incrível!

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por todo o auxílio prestado.

A todos os colegas de Pós-Graduação, com quem convivi durante esses 5 anos, pela gentileza e por compartilharem conhecimento. Principalmente às queridas Fabiani Santana e Karoline Panato pelo carinho, cafezinhos, por me inspirarem como alunas e pessoas e por compartilharem comigo um pouco de suas vidas e acompanharem um pouco da minha. Também aprendi muito com vocês!

Às técnicas do CEBIME/UFSC Martina Blank e Vanessa Oliveira por todo apoio para a realização desse trabalho. Sem a ajuda de vocês grande parte desse estudo não poderia ter sido realizado. Vocês são profissionais que inspiram!

À Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa e à Dra. Siluana Seraglio pela colaboração para a realização do terceiro capítulo desse trabalho. Muito obrigada por toda a ajuda!

À Profa. Dra. Isabela Toaldo, sempre muito gentil e disponível. Sua ajuda foi fundamental nos últimos meses.

À Profa. Dra. Renata Amboni pela doação de reagentes para a realização do terceiro capítulo desse trabalho e pelas importantes contribuições feitas, desde a qualificação.

Ao Prof. Dr. Pedro Miguel Guerra e as Profas. Dras. Carmem Muller e Edna Regina Amante pela contribuição com equipamentos, reagentes ou auxílio.

À Profa. Dra. Thais de Souza Rocha por ter aceito o convite para ser a Relatora da Tese e pelas importantes contribuições feitas.

Aos membros da banca.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de extrema importância para países em desenvolvimento por seu alto teor em carboidratos e proteínas. Seus grãos consumidos após processos como o cozimento ou a germinação fornecem diversos compostos que trazem benefícios para a saúde. No Brasil, cultivares como 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio' e 'BRS Estilo' foram desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) para oferecer alto rendimento aos agricultores e excelente qualidade para o consumidor final. Essas cultivares pertencentes aos grupos comerciais mais produzidos e consumidos no país, como carioca e preto, e por um grupo comercial diferenciado, como o rosinha, carecem de estudos sobre seu perfil proteico e atividade antioxidante após diferentes tipos de processamento e digestão *in vitro*. Neste trabalho, primeiramente foram avaliados os proteomas de grãos secos das quatro cultivares de feijão por eletroforese bidimensional (2-DE), espectrometria de massas (MS) e análise de componentes principais (ACP). Posteriormente, foram avaliados por 2-DE e ACP, o proteoma de grãos germinados por 36 h e 72 h, de duas das quatro cultivares de feijão. Além disso, a capacidade antioxidante dos grãos germinados e de grãos cozidos dessas cultivares, e de seus respectivos isolados proteicos, foi determinada por métodos espectrofotométricos distintos, antes e após digestão enzimática *in vitro*. Na comparação do proteoma de grãos secos por 2-DE, uma média de 525 *spots* de proteínas foram detectados nas quatro cultivares de feijão e destes, 349 estavam presentes em todos os géis bidimensionais. A ACP mostrou que a porcentagem de volume dos 349 *spots* correspondentes separou claramente a cultivar 'BRS Estilo' das demais cultivares no componente principal 1 (CP1) e as cultivares 'BRS Sublime' e 'BRS Esteio' no CP2, indicando maior proximidade com relação ao acúmulo de proteínas, em grãos secos, nas cultivares 'BRS Sublime' e 'BRS Vereda'. Além disso, trinta e duas proteínas diferencialmente acumuladas entre as quatro cultivares foram identificadas por MS, dentre elas, proteínas de armazenamento como faseolinas, leguminas e lectinas, importantes nutricionalmente e para os programas de melhoramento do feijão. Na segunda etapa desse estudo, com grãos das cultivares 'BRS Sublime' e 'BRS Vereda' germinados por 36 h e 72 h, uma média de 776 *spots* de proteínas foram detectados por 2-DE nos dois tempos de germinação. Para a ACP, as porcentagens de volume de 232 *spots* presentes em todos os géis bidimensionais foram utilizadas e os diferentes tempos de germinação demonstraram maior influência na expressão de proteínas do que as diferentes cultivares. A Análise de Variância mostrou que houve uma redução no volume dos *spots* com massas moleculares relativas acima de 37 kDa e um aumento nos *spots* de menor massa molecular, com o aumento do tempo de germinação. Grãos germinados por 36 h promoveram maior capacidade antioxidante antes e após digestão *in vitro* para as duas cultivares avaliadas, em pelo menos dois dos três métodos espectrofotométricos utilizados. Nos isolados proteicos, grãos cozidos promoveram maior capacidade antioxidante antes e após digestão *in vitro*, na cultivar 'BRS Vereda'. Este estudo forneceu os primeiros mapas proteicos por 2-DE de grãos secos e germinados em dois tempos para essas cultivares, além de avaliar a capacidade antioxidante dos grãos e de seus isolados proteicos após diferentes tipos de processamento tanto antes quanto após digestão *in vitro*.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., proteínas, eletroforese bidimensional, análise de componentes principais, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume of extreme importance for developing countries due to its high content of carbohydrates and proteins. The grains consumed after processes such as cooking or germination provide several compounds that can confer health benefits. In Brazil, cultivars such as 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio' and 'BRS Estilo' were developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) to offer high yield to farmers and excellent quality to the final consumer. These cultivars belong to the most produced and consumed commercial groups in Brazil, as carioca, black and rosinha. There are few studies about their protein profile and antioxidant activity, mainly after different types of processing and digestion in vitro. In this work, dry grain proteomes of four bean cultivars were evaluated by two-dimensional electrophoresis (2-DE), mass spectrometry (MS) and principal component analysis (ACP). Then, grains of four bean cultivars were germinated during 36 hours and 72 hours and its proteome was evaluated by 2-DE and ACP. In addition, the antioxidant capacity of the germinated and cooked grains of these cultivars, and their respective protein isolates were determined by different spectrophotometric methods, before and after enzymatic digestion in vitro. When comparing the proteome of dry grains by 2-DE, an average of 525 protein spots were detected in the four bean cultivars and of those, 349 were present in all two-dimensional gels. The ACP showed that the volume percentage of the 349 corresponding spots clearly separated the cultivar 'BRS Estilo' from the other cultivars in main component 1 (CP1) and the cultivars 'BRS Sublime' and 'BRS Esteio' in CP2, indicating greater proximity with respect to accumulation of proteins in dry grains in cultivars 'BRS Sublime' and 'BRS Vereda'. Therefore, thirty-two proteins differentially accumulated among the four cultivars were identified by MS, including storage proteins such as phaseolins, legumes and lectins, which are nutritionally important and for bean breeding programs. In the second stage of this study, grains from the cultivars 'BRS Sublime' and 'BRS Vereda' germinated for 36 h and 72 h, an average of 776 protein spots were detected by 2-DE in the two germination times. For ACP, the volume percentages of 232 spots present in all two-dimensional gels were used and the different germination times demonstrated a greater influence on the expression of proteins than the different cultivars. The Analysis of Variance showed that there was a reduction in the volume of the spots with relative molecular masses above 37 kDa and an increase in the spots of lesser molecular mass, with the increase of the germination time. Grains germinated for 36 h promoted greater antioxidant capacity before and after digestion in vitro for the two cultivars evaluated, in at least two of the three spectrophotometric methods used. In protein isolates, cooked grains promoted greater antioxidant capacity before and after digestion in vitro, in the cultivar 'BRS Vereda'. This study provided the first 2-DE protein maps of dry and germinated grains in two stages for these cultivars, in addition to evaluating the antioxidant capacity of the grains and their protein isolates after different types of processing both before and after in vitro digestion.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., proteins, two-dimensional electrophoresis, principal component analysis, antioxidant capacity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Área e produção de feijão total seco no mundo de 1994 a 2017.....24
- Figura 2.** Localização de polifenóis e peptídeos em sementes de feijão comum.....32
- Figura 3.** Etapas normalmente realizadas na Análise Proteômica baseadas nas diferentes estratégias utilizadas.....38

CAPÍTULO II - COMPARISON OF GRAIN PROTEOME PROFILES OF FOUR BRAZILIAN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) CULTIVARS

- Figure 1.** Reference maps of common bean grain proteome from (A) 'BRS Sublime', (B) 'BRS Vereda', (C) 'BRS Esteio', and (D) 'BRS Estilo' cultivars.....61
- Figure 2.** PCA plots of 349 matched spots volume (%Vol) of 2DE gels from grains of four common bean cultivars: (A) 'BRS Sublime', (B) 'BRS Vereda', (C) 'BRS Esteio', and (D) 'BRS Estilo'. Numbers 1, 2, and 3 refer to the triplicate of each cultivar gels.....63
- Figure 3.** (A) Differentially accumulated proteins present in the four common bean cultivars identified by MS and MS/MS, marked by arrows (reference gel, C2). (B) Spots 223 excised from gels of 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio', and 'BRS Estilo' cultivars from left to right, respectively, in 2D and 3D images. (C) Exclusive spots of 'BRS Vereda' cultivar (585, 586, and 587) and 'BRS Esteio' cultivar (605 and 603), marked by squares and selected in ImageMaster in one of triplicate gels of each cultivar.....64
- Figure 4.** Average of spot volume percentage (% vol) of 35 differentially accumulated proteins from triplicate gels of 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio', and 'BRS Estilo' cultivars.....65

CAPÍTULO III - PROTEIN PROFILE AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF PROCESSED GRAINS FROM TWO COMMON BEAN CULTIVARS (*Phaseolus vulgaris* L.)

- Figure 1.** Determination of the antioxidant capacity (AC) in cooked and germinated common bean and their respective protein isolates by different spectrophotometric methods.....104
- Figure 2.** 2-DE gels obtained from 250 µg of grain proteins germinated for 36h and 72h, from two common bean cultivars. (A): reference gel of germinated grains for 36 hours, cultivar 'BRS Vereda'; (B): reference gel of germinated grains for 72 hours, cultivar 'BRS Vereda'; (C):

reference gel of germinated grains for 36 hours, cultivar 'BRS Sublime'; (D): gel reference of germinated grains for 72 hours, cultivar 'BRS Sublime'.....107

Figure 3. PCA for volume percentage of 232 matched spots of 2-DE gels from germinated grains of two common bean cultivars. (V 36 h): grains of 'BRS Vereda' cultivar germinated by 36 h, (V 72 h): grains of 'BRS Vereda' cultivar germinated by 72 h, (S 36 h): grains of 'BRS Sublime' cultivar germinated by 36 h and (S 72 h): grains of 'BRS Sublime' cultivar germinated by 72 h. Letters A, B and C refer to the triplicate of each cultivar gels.....108

Figure 4. Antioxidant capacity of cooked (C) and germinated common bean grains (G 36 h and G 72h), from two cultivars ('BRS Vereda' and 'BRS Sublime'), before and after in vitro digestion (BD: before digestion, AD: after digestion), by different methods. The values represent the mean \pm SD (n = 3). Determination of antioxidant capacity by the Folin-Ciocalteu method (A) and (B); DPPH (C) and (D), both expressed in milligrams equivalent to gallic acid per gram of sample (mg GAE/g) and FRAP (E) and (F), expressed in micromol equivalent to Trolox per gram of sample (μ mol TE/g).....110

Figure 5. Antioxidant capacity of protein isolates (PI) from cooked (C) and germinated common bean grains (G36 h and G 72 h), from two cultivars ('BRS Vereda' and 'BRS Sublime'), before and after in vitro digestion (BD: before digestion, AD: after digestion), by different methods. The values represent the mean \pm SD (n = 3). Determination of antioxidant capacity by the Folin-Ciocalteu method (A) and (B); DPPH (C) and (D), both expressed in milligrams equivalent to gallic acid per gram of soluble protein (mg GAE/SP) and FRAP (E) and (F), expressed in micromol equivalent to Trolox per gram of soluble protein (μ molTE/SP).....112

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - COMPARISON OF GRAIN PROTEOME PROFILES OF FOUR BRAZILIAN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) CULTIVARS

Table 1. Identification of Differentially Accumulated Proteins among Four Common Bean Cultivars, 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio', and 'BRS Estilo', by Peptide Mass Fingerprint (PMF) and MS/MS.....67

CAPÍTULO III - PROTEIN PROFILE AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF PROCESSED GRAINS FROM TWO COMMON BEAN CULTIVARS (*Phaseolus vulgaris* L.)

Table 1. Comparison by 2-DE among the three gels (A, B and C) of each sample (V: 'BRS Vereda', S: 'BRS Sublime') and among the germination times of each cultivar.....106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	acetonitrila
BSA	albumina sérica bovina (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>)
CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-propano- sulfonato) (do inglês, <i>3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-Propanesulfo-nate</i>)
CA	capacidade antioxidante
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
D.O.	densidade ótica
1-DE	Eletroforese unidimensional
2-DE	Eletroforese Bidimensional (do inglês, <i>Two-dimensional gel electrophoresis</i>)
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	ditiotreitól (do inglês, <i>dithiothreitol</i>)
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético (do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionisation</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GAE	equivalente de ácido gálico (do inglês, <i>Gallic acid equivalent</i>)
GM	geneticamente modificado
ICAT	Marcador de afinidade enriquecido isotopicamente (do inglês, <i>isotope coded affinity tag</i>)
IEF	Focalização Isoelétrica (do inglês, <i>Isoelectric focusing</i>)
iTRAQ	Marcador isobárico para quantificação relativa e absoluta (do inglês, <i>isobaric tag for relative and absolute quantitation</i>)
IPG	gel de pH imobilizado (do inglês, <i>Immobilized pH gradient gels</i>)
LC	Cromatografia Líquida (do inglês, <i>Liquid Chromatography</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MM	massa molar
MS	Espectrometria de Massa (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>)

PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
pI	ponto isoelétrico
PMF	impressão digital de massas peptídicas (do inglês, <i>Peptide mass fingerprint</i>)
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonil (do inglês, <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)
PS	proteína solúvel
PTMs	modificações pós-traducionais
RNA	ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SILAC	Análise da razão de isótopos estáveis em aminoácidos em cultura de células (do inglês, <i>stable isotope ratio analysis of amino acids in cell culture</i>)
TE	equivalente ao Trolox (do inglês, <i>Trolox Equivalents</i>)
TCA	ácido tricloroacético (do inglês, <i>trichloroacetic acid</i>)
TOF	tempo de voo (do inglês, <i>time-of-flight</i>)
TROLOX	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1 FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	23
1.1 Melhoramento genético do feijão comum.....	25
1.2 Composição nutricional do feijão comum.....	27
1.3 Proteínas do feijão comum.....	28
1.4 Compostos bioativos do feijão comum.....	29
1.5 Processamento do feijão comum.....	33
2 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	36
2.1 Separação das proteínas por 2-DE.....	39
2.2 Espectrometria de massas (MS).....	41
2.3 Proteômica de feijão comum.....	42
3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP).....	44
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO II - COMPARISON OF GRAIN PROTEOME PROFILES OF FOUR BRAZILIAN COMMON BEAN (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CULTIVARS.....	52
ABSTRACT.....	54
1 INTRODUCTION.....	55
2 MATERIALS AND METHODS.....	56
2.1 Plant Material.....	56
2.2 Protein Extraction.....	56
2.3 Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE) Analyses.....	56
2.4 Image and Data Analysis.....	57
2.5 Mass Spectrometry.....	58
2.6 2-DE Standardization.....	58
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	60
3.1 2-DE Standardization.....	60
3.2 Comparison among Four Cultivars.....	62
3.3 Principal Component Analysis.....	62
3.4 Differentially Accumulated Proteins.....	
3.5 Protein Identification.....	66
REFERENCES.....	90

CAPÍTULO III - PROTEIN PROFILE AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF PROCESSED GRAINS FROM TWO COMMON BEAN CULTIVARS (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	96
ABSTRACT	98
1 INTRODUCTION.....	99
2 MATERIALS AND METHODS.....	100
2.1 Plant material	100
2.2 Sample preparation	100
2.2.1 Germination of common bean grains.....	100
2.2.2 Cooking of common bean grains.....	100
2.2.3 Protein extraction.....	101
2.2.4 Phenolic compounds extraction.....	101
2.2.5 Protein isolates extraction.....	101
2.3 Enzymatic digestion in vitro	101
2.4 Quantification of soluble proteins	102
2.5 Two-dimensional electrophoresis (2-DE)	102
2.6 Image and Data Analysis	102
2.7 Determination of antioxidant capacity	102
2.7.1 Folin-Ciocalteu reducing capacity.....	102
2.7.2 DPPH free radical scavenging assay.....	103
2.7.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.....	103
2.8 Statistics	103
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	105
3.1 Comparison of germinated grains protein profile by 2-DE and PCA	105
3.2 Determination of the antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars, before and after enzymatic digestion in vitro	109
REFERENCES	117
CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
ANEXO A – Primeira página da publicação do artigo “ Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Bazilian Common Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Cultivars”	123
ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo “Protein profile and antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)”	124

INTRODUÇÃO

As leguminosas estão entre os principais grupos de plantas, destacando-se na alimentação humana, como forragem para animais, na produção de óleos comestíveis e industriais e nos ecossistemas agronômicos graças a sua habilidade de realizar fixação biológica de nitrogênio (DAS; PARIDA, 2014). Adaptam-se a diferentes condições climáticas e tipos de solo (SMYKAL et al., 2015) e seus grãos são ricos em carboidratos, proteínas, fibras, vitaminas e minerais (DUENAS et al., 2016). Devido a sua composição, baixo índice glicêmico, potencial antioxidante e ausência de glúten, grãos de leguminosas podem contribuir para a melhoria da qualidade nutricional na produção de alimentos (PATTO et al., 2015).

Nesse contexto, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se como a principal leguminosa para o consumo humano direto, contribuindo com até 36 % das proteínas totais diárias ingeridas em partes da África e das Américas (SCHMUTZ et al., 2014). Recentemente, teve seu genoma publicado (SCHMUTZ et al., 2014; VLASOVA et al., 2016), facilitando outros estudos a nível molecular como a proteômica e metabolômica, que possibilitam o entendimento sobre os mecanismos de adaptação de leguminosas às condições adversas que estão submetidas, as quais limitam a sua produtividade (RAMALINGAM et al., 2015). Produtividade agrícola e qualidade nutricional são as questões-chave para a produção sustentável de alimentos no mundo (NARULA et al., 2015). Nesse sentido, a proteômica, aliada a genômica e a transcriptômica, provavelmente aumentará o mérito agronômico e as características de qualidade dessa cultura (ZARGAR et al., 2015).

Muitas metodologias são utilizadas para estudar as proteínas em larga escala, porém, em termos de rendimento e sensibilidade, as abordagens baseadas na espectrometria de massas (MS) são mais adequadas (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014). A espectrometria de massas para proteínas é altamente dependente dos métodos de separação que podem ser realizados por eletroforese em gel (CUNSOLO et al., 2014). A eletroforese bidimensional tornou-se uma técnica importante na investigação do proteoma de leguminosas, devido a sua sensibilidade, capacidade de separação e visualização de centenas de proteínas e acessibilidade à automação (ZARGAR et al., 2017).

O feijão comum é um alimento importante na dieta dos brasileiros e seus grãos são submetidos a diferentes técnicas de processamento antes da sua ingestão, dentre elas,

o cozimento e a germinação. De maneira geral, esses processos aumentam o valor nutricional e reduzem compostos antinutricionais em leguminosas, além de atuarem de maneira diferente sobre compostos bioativos (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2017). Compostos bioativos do feijão comum apresentam atividades com benefícios para a saúde humana e tem sido objeto de diversos estudos (MOJICA; CHEN; DE MEJÍA, 2015; SOUZA-ROCHA et al., 2015; MOJICA; DE MEJÍA, 2016; MOJICA; LUNA-VITAL; DE MEJÍA, 2017). Germinação ou cozimento associados ou não a modelos de digestão *in vitro* vem sendo aplicados, separadamente, para avaliação de compostos bioativos presentes no feijão comum. (GUZMÁN-MENDEZ et al., 2014; LIMÓN et al., 2014; MOJICA; CHEN; DE MEJÍA, 2015; SOUZA-ROCHA et al., 2015; MAMILLA E MISHRA, 2017).

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores mundiais de feijão e diversas cultivares de *P. vulgaris* estão disponíveis para plantio no país. As cultivares 'BRS Sublime', 'BRS Estilo', 'BRS Esteio' e 'BRS Vereda' foram desenvolvidas pela Embrapa e pertencem a grupos comerciais distintos, dentre eles os mais consumidos e produzidos no país, carioca e preto e a um grupo comercial diferenciado, o rosinha. Os grãos dessas cultivares não foram caracterizados quanto ao seu perfil proteico e capacidade antioxidante após diferentes tipos de processamento. Dentro desse contexto, a primeira etapa desse trabalho teve como objetivo comparar por 2-DE e ACP o perfil proteico dos grãos secos e identificar por MS as proteínas diferencialmente acumuladas entre as quatro cultivares. A segunda etapa, teve como objetivo avaliar o perfil proteico de grãos germinados em dois tempos e determinar a capacidade antioxidante dos grãos germinados e cozidos, e dos seus isolados proteicos, em conjunto, antes e após digestão *in vitro*. Assim, esta tese é apresentada em capítulos.

No Capítulo I, é exposto o referencial teórico com os principais temas utilizados para a realização desse estudo como a importância do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no cenário mundial e no Brasil; o melhoramento dessa leguminosa e as cultivares utilizadas neste trabalho; sua composição em termos de proteínas e alguns compostos bioativos presentes; diferentes tipos de processamentos à que os grãos são submetidos antes do seu consumo como o cozimento e a germinação, e sua relação com os compostos bioativos e atividade antioxidante; e por fim um breve relato sobre a análise proteômica e as metodologias dentro dessa ferramenta utilizadas nesse trabalho.

No Capítulo II é apresentado o artigo intitulado: Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars, publicado na revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (A1, IF: 3,571), em 2017.

No Capítulo III é apresentado o artigo intitulado: Protein profile and antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.), submetido na revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Posteriormente, são apresentadas as considerações finais sobre os resultados obtidos nos capítulos II e III e possíveis perspectivas para estudos futuros com essa importante cultura na alimentação humana.

REFERÊNCIAS

- CATHERMAN, A. D; SKINNER, O. S; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 445:683-693, 2014.
- CUNSOLO, V. et al. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. **Journal of Mass Spectrometry**, 49:768-784, 2014.
- DAS, A; PARIDA. S. K. Advances in biotechnological applications in three important food legumes. **Plant Biotechnol Rep**, 8:83-99, 2014.
- DUENAS, M. et al. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). **Lwt-Food Science and Technology**, 66:72-78, 2016.
- GUZMÁN-MÉNDEZ, B. et al. Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris*. **Int J Food Sci Tech**, 49: 1859–1868, 2014.
- LIMÓN, R. I. et al. Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. **LWT Food Science and Technology**, 56: 328-334.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X. et al. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. **Journal of functional foods**, 38: 624-634, 2017.
- MAMILLA, R. K; MISHRA, V. K. Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. **LWT - Food Science and Technology**, 75: 51-58, 2017.
- MOJICA, L; CHEN, K; DE MEJÍA, E. G. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. **Journal of Food Science**, 80: H188-H198, 2015.
- MOJICA, L; DE MEJÍA, E. G. Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. **Food & Function**, 7, 713–727, 2016.
- MOJICA, L; LUNA-VITAL. D. A; DE MEJÍA. E. G. Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97: 2401– 2410, 2017.
- PATTO, M. C. V. et al. Achievements and Challenges in Improving the Nutritional Quality of Food Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 34:105–143, 2015.
- RAMALINGAM, A. et al. Proteomics and Metabolomics: Two Emerging Areas for Legume Improvement. **Frontiers in Plant Science**, 6, 2015.

SCHMUTZ, J. et al. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, 46:707-713, 2014.

SMÝKAL, P. et al. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 34:43-104, 2015.

SOUZA-ROCHA, T. et al. Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes in vitro. **Food research international**, 76:150-159, 2015.

VLASOVA et al. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome Biology**, 17:32, 2016.

ZARGAR, S. M. et al. Towards a common bean proteome atlas: looking at the current state of research and the need for a comprehensive proteome. **Frontiers in Plant Science**, 2015.

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijão comum é considerado a leguminosa mais importante para o consumo humano direto, principalmente por ser fonte econômica de proteína para países em desenvolvimento como em regiões da América Latina e da África (CARVALHO et al., 2015; MEZIADI et al., 2016).

Sua evolução ocorreu a partir de um ancestral comum divergindo para dois *pools* genéticos distintos geograficamente, o Mesoamericano e o Andino (SCHMUTZ et al., 2014). A partir dessas duas populações selvagens, o feijão comum foi domesticado independentemente no México, principal região de domesticação do *pool* Mesoamericano estendendo-se até a Venezuela e a Colômbia, e na América do Sul onde o *pool* genético andino é encontrado no Peru, Chile, Bolívia e Argentina (BITOCCHI et al., 2012; MAMIDI et al., 2013).

Em 2014, o genoma do feijão comum, derivado de um *pool* Andino (G19833), foi publicado com 473 Mb. Esses autores compararam o genoma do feijão com uma cultura intimamente relacionada (soja) e realizaram uma análise de variação genética em 60 indivíduos selvagens e 100 variedades de origem genética dos grupos de genes de origem mesoamericana e andina (SCHMUTZ et al., 2014). Em 2016, foi publicado o genoma de um genótipo Mesoamericano de feijão comum (BAT93) de 549,6 Mb, juntamente com um transcriptoma detalhado dos diferentes órgãos e tecidos durante o desenvolvimento da planta (VLASOVA et al., 2016).

No Brasil, em estudo anterior a publicação dos genomas, a presença dos dois *pools* genéticos, Andino e Mesoamericano, foi observada pelos autores que avaliaram a diversidade genética de 279 variedades crioulas geo-referenciadas brasileiras através de marcadores moleculares, sendo o *pool* Mesoamericano o mais representativo dentre as variedades analisadas (BURLE et al., 2010).

Feijões são consumidos como grãos secos, produzidos principalmente na Índia e Brasil, ou como vegetais, onde a maior produção se concentra na China (BROUGHTON et al., 2003; SMÝCAL et al., 2015; FAOSTAT, 2019). Myanmar, EUA e China foram os maiores exportadores de feijão total seco no mundo em 2017 e Índia, Quênia e EUA os maiores importadores. O Brasil, além de se destacar como terceiro maior produtor mundial, nesse mesmo ano, esteve também entre os maiores importadores e exportadores de feijão seco no mundo (FAOSTAT, 2019). De 2013 a 2017, a área cultivada e a produção de feijão seco no mundo aumentaram, chegando a aproximadamente 36 milhões

de hectares cultivados e 31 milhões de toneladas de feijão seco produzidos, os maiores números desde 1994 (Figura 1).

Figura 1. Área e produção de feijão total seco no mundo de 1994 a 2017.



Fonte: FAOSTAT, 2019.

De acordo com a Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nº 12 de 2008, no Brasil são considerados feijões, os grãos provenientes das espécies *Phaseolus vulgaris* L e *Vigna unguiculata* (L) Walp (BRASIL, 2008). *Phaseolus vulgaris* L. é a espécie de feijão mais cultivada e consumida no país, compreendendo desde a agricultura de subsistência até a utilização da mais moderna tecnologia de produção (EMBRAPA, 2012). Seu plantio é concentrado em três safras: na 1ª safra ou “safra das águas” a semeadura é feita entre agosto e outubro e a colheita de novembro até março; na 2ª safra ou “safra da seca” a semeadura ocorre entre janeiro e abril e a colheita de abril até julho e, na 3ª safra também conhecida como “safra de outono-inverno”, a semeadura é realizada a partir de maio, com a colheita entre agosto e outubro (EMBRAPA, 2012). Os grãos dessa espécie apresentam alta variabilidade quanto à cor, forma e tamanho, havendo uma preferência por determinada variedade dependendo da região. Em relação à coloração do tegumento, o feijão comum pode ser dividido em quatro classes: branco (97 % de grãos com coloração branca), preto (97 % de grãos com coloração preta), cores (pode conter no máximo 3 % de mistura de outras classes e 10 % de mistura de outras cultivares da classe cores, porém com cores contrastantes ou tamanhos diferentes) e misturado (não se encaixa em nenhuma das outras classes)

(BRASIL, 2008). Além disso, diferenças nas características externas dos grãos como por exemplo, estrias, manchas, cor brilhante, opaca ou com nuances, dentre outras, são utilizadas para classificar os grãos em tipos comerciais.

Os feijões do grupo comercial carioca são os mais consumidos pelos brasileiros sendo, portanto, os mais cultivados, seguidos dos feijões do grupo comercial preto, que possui maior demanda no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Espírito Santo (MELO et al., 2012).

De acordo com a Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP, 2012) apesar da oferta e demanda oscilar nas últimas safras, os feijões estão entre os produtos que continuarão dependendo de importações que podem representar 2,4% do consumo nacional em 2021/2022. Para a 1ª safra 2019/2020 estima-se uma produção de feijão total 5 % superior ao mesmo período 2018/2019 apesar da redução em área para essa cultura (CONAB, 2020).

1.1 Melhoramento genético do feijão comum

O melhoramento consiste na obtenção de uma característica desejada, em uma espécie de cultivo, através da seleção entre indivíduos ou populações geneticamente variáveis, com o objetivo de trazer benefícios para o agricultor (BROUGHTON et al., 2003). Culturas como o feijão comum, estão expostas a fatores que resultam em estresses bióticos e abióticos, levando a uma diminuição no seu rendimento e estado nutricional. Dessa forma, melhorar essa leguminosa exige uma compreensão fundamental da resposta a esses estresses que são o principal foco do melhoramento do feijão comum no mundo (SCHMUTZ et al., 2014; ASSEFA et al., 2019). Em países desenvolvidos, onde o foco da produção é a exportação, o melhoramento se concentra na resistência para as principais pragas e doenças. Já nos países em desenvolvimento além das doenças e pragas, a seca e a baixa fertilidade do solo são o objetivo das pesquisas (ASSEFA et al., 2019).

No Brasil, o cultivo do feijão comum compreende desde a agricultura de subsistência até a utilização da mais moderna tecnologia de produção (EMBRAPA, 2012) e devido à diversidade de ecossistemas em que é cultivado no país, vem sendo melhorado para atender às exigências da cadeia de produção. De acordo com Tsutsumi, Bulegon e Piano (2015) os objetivos do melhoramento dessa leguminosa incluem a fixação biológica de nitrogênio, resistência a doenças e insetos, tolerância à seca, adaptação à colheita mecânica, aumento na produção de grãos, melhoria na qualidade nutricional e no

tempo de cozimento. Segundo De Faria et al. (2013), entre os anos de 1984 e 2010 o programa de melhoramento genético do feijão comum da Embrapa lançou cinquenta novas cultivares. Esse estudo demonstrou que entre 1985 e 2006 o programa da Embrapa para o melhoramento genético do feijão carioca apresentou avanços genéticos significativos em termos de rendimento de grãos (0,72 % ao ano), arquitetura de plantas (2 % ao ano), resistência ao acamamento (2 % ao ano) e qualidade de grãos (2,4 % ao ano) nas principais áreas brasileiras produtoras de feijão. Nesse mesmo período, os avanços genéticos no programa da Embrapa para o melhoramento genético do feijão preto foram de 1,1% ao ano para rendimento de sementes, 1,7% ao ano para tolerância ao acamamento e 0,65% ao ano para peso de 100 sementes (DE FARIA et al., 2014). Segundo Parreira et al (2016), o feijão comum é promissor como modelo agrícola para o estudo da biologia de sementes. Até 2015, somente a Embrapa lançou em média 1,8 cultivares por ano, com diferentes tipos de grãos (WENDLAND et al., 2018).

A cultivar 'BRS Vereda', pertencente ao grupo comercial rosinha, foi lançada pela Embrapa em 2002, como uma nova alternativa para os consumidores em relação aos tradicionais grãos carioca e preto. Esse tipo de grão possui maior valor agregado para os produtores nos estados de Goiás, Distrito federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina e apresenta resistência às principais doenças do feijão além de possuir excelentes propriedades culinárias (DE FARIA et al., 2004; EMBRAPA, 2003).

A cultivar 'BRS Estilo', do grupo comercial carioca, foi lançada em 2009 e possui arquitetura que possibilita a colheita mecanizada (MELO et al., 2010), apresentando também alto rendimento e resistência a doenças, além de ser apropriada para plantio em diversos estados incluindo Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

Pertencente ao grupo comercial preto, a cultivar 'BRS Esteio', lançada em 2012, tem como destaque o alto potencial produtivo, além da resistência ao vírus do mosaico comum e moderada resistência à antracnose, sendo indicada para semeadura em diversos estados (PEREIRA et al., 2013).

Recentemente, foi lançada pela Embrapa cultivar 'BRS Sublime', do grupo comercial carioca, com recomendação para plantio em 19 estados brasileiros. Essa cultivar possui maior potencial para uso em programas de biofortificação de ferro e zinco e seus grãos apresentam boas propriedades culinárias e nutricionais, possuindo tamanho, forma e cor semelhantes às cultivares Pérola e 'BRS Estilo', o que indica um alto potencial comercial para esta cultivar (WENDLAND et al., 2018).

Em comparação com os cereais, grãos de leguminosas como o feijão comum, apresentam rendimento mais baixo, o que é um desafio agrônomo. Em contrapartida, são boas fontes de proteínas, tornando-as boas substitutas para proteínas animais (MUÑOZ et al., 2017). Além disso, possuem um papel importante na agricultura sustentável, por sua contribuição nas rotações das culturas e no aumento da fertilidade do solo em áreas áridas e onde o nitrogênio é baixo (MOUSAVI-DERAZMAHALLEH et al., 2019).

1.2 Composição nutricional do feijão comum

O feijão comum é considerado um alimento crucial, por sua constituição em carboidratos, proteínas, fibras, vitaminas e minerais (PARREIRA et al., 2016). Os carboidratos representam de 50 a 60 % do grão e são constituídos principalmente de amido (SATHE, 2002), seguido de fibras e oligossacarídeos que estão presentes em menores quantidades (LOS et al., 2018). Em comparação com outros alimentos básicos, o feijão comum destaca-se por conter até três vezes mais fibras por 100g de alimento (LOS et al., 2018). Essa fração, juntamente com o amido resistente e seus produtos de fermentação contribuem para o baixo índice glicêmico de feijões e estão associados à proteção da saúde do cólon (LOS et al., 2018).

As proteínas representam de 20 a 25 % do grão (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012) e são de extrema importância na dieta de países em desenvolvimento como um componente crítico para combater a desnutrição (MEZIADI et al., 2016).

Os lipídeos compreendem cerca de 2% do grão, porém são ricos em ácidos graxos insaturados com predominância dos ácidos linolênico e linoleico, seguido dos ácidos palmítico e oleico (HAYAT et al., 2014; LOS et al., 2018).

Em menores quantidades estão as vitaminas como a tiamina, riboflavina, niacina e folacina (LAJOLO et al., 1996) e variações no conteúdo são observadas em diferentes classes de feijão (HAYAT et al., 2014). Dentre as leguminosas, o feijão comum também se destaca pela quantidade em minerais sendo importante fonte de ferro, zinco, cobre, fósforo e alumínio (HAYAT et al., 2014). Além disso, outros compostos como os taninos (KRUPA, 2008) e o ácido fítico e seus sais (fitatos), que representam entre 54 e 82 % do conteúdo de fósforo do grão, estão presentes nesta leguminosa (BROUGHTON et al., 2003).

1.3 Proteínas do feijão comum

As proteínas presentes no feijão comum podem ser divididas em dois grupos: as globulinas que variam de 45 até 70 % e são solúveis em solução salina e as albuminas que respondem por 10 a 30 % da proteína total e são solúveis em água (NATARAJAN et al., 2013). Globulinas são as proteínas de reserva mais abundantes em grãos de leguminosas e são classificadas como proteínas 7S e 11S de acordo com seu coeficiente de sedimentação (S) (DURANTI, 2006). A principal globulina presente no feijoeiro é a faseolina 7S, uma glicoproteína que representa de 40 a 50 % do nitrogênio total da semente (MONTROYA et al., 2010) e é deficiente em aminoácidos sulfurados como metionina, cisteína e triptofano (DE LA FUENTE et al., 2012). Outra globulina presente no feijão comum é a legumina 11S que possui níveis mais elevados de aminoácidos sulfurados, incluindo cisteína, quando comparada com globulinas 7S (NATARAJAN et al., 2013). Já as albuminas encontradas são compostas por diferentes proteínas como a lectina e inibidores de enzimas (NATARAJAN et al., 2013). A família das lectinas compreende inibidor de alfa-amilase, arcelina, fitohemaglutinina entre outras proteínas, que representam 10 % das proteínas do grão (MARSOLAIS et al., 2010) e que dependendo da concentração podem apresentar tanto efeitos negativos quanto positivos na saúde humana (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012).

No primeiro estudo sobre o perfil proteico total de sementes de feijão comum, os autores compararam diferentes métodos de extração e identificaram 50 proteínas com diferentes funções biológicas como: armazenamento, metabolismo de carboidratos, defesa, resposta ao estresse, desintoxicação, crescimento e desenvolvimento, transporte de proteínas e metabolismo de nitrogênio, sendo a maioria proteínas de armazenamento como as faseolinas (DE LA FUENTE et al., 2011).

Num segundo estudo sobre o perfil total de proteínas de semente do feijão comum, 141 proteínas foram identificadas e 41,5 % foram classificadas como envolvidas na atividade de ligação, 35,8 % possuíam atividade catalítica e 7,5 % exibiam atividade de armazenamento (NATARAJAN et al., 2013). Além das proteínas de armazenamento já citadas, esses autores encontraram proteínas relacionadas ao estresse, como as proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA, de *late embryogenesis abundant*), que são proteínas encontradas em plantas submetidas a condições como frio, seca e alta salinidade e proteínas de choque térmico (HSPs de *heat shock proteins*), sintetizadas em resposta a temperaturas elevadas. Além disso, esses autores identificaram proteínas envolvidas no

metabolismo de modo geral, como superóxido dismutase (SOD), glutamina sintetase, metionina sintase, proteína ligada a rRNA 60S, ATP sintase subunidade beta, quinases, dissulfeto isomerases, triose-fosfato isomerase e álcool desidrogenases 2b. Esse foi o primeiro estudo onde um grande número de proteínas dessa leguminosa foi identificado.

Um atlas abrangente do acúmulo de proteínas durante o desenvolvimento da semente foi publicado por Parreira et al. (2016). Esses autores observaram nos estágios iniciais do desenvolvimento proteínas relacionadas à atividade metabólica, nos estágios intermediários, proteínas relacionadas com síntese de compostos de armazenamento e nos estágios posteriores um forte aumento nas proteínas relacionadas ao metabolismo redox e, em menor extensão, proteínas de degradação, modificação, dobramento e metabolismo dos ácidos nucleicos sugerindo ativação dos mecanismos de desidratação-resistência da semente.

1.4 Compostos bioativos do feijão comum

O feijão é rico em compostos bioativos, substâncias com atividades biológicas que promovem benefícios à saúde (ANGIOLILLO; DEL NOBILE; CONTE, 2015), dentre eles, peptídeos e compostos fenólicos (LOS et al., 2018).

Ácidos fenólicos, proantocianidinas e outros flavonoides, são os principais polifenóis presentes no feijão comum, que atuam na redução do risco de alguns tipos de câncer e doenças como diabetes, Alzheimer e Parkinson (CHÁVEZ-MENDOZA; SÁNCHEZ, 2017; YANG et al., 2018). Esses compostos possuem diversas atividades e são os compostos bioativos predominantes em diferentes cultivares (YANG et al., 2018). Estão presentes tanto no cotilédone, em menores quantidades, quanto no tegumento, onde se concentra a maioria dos fenólicos (YANG et al., 2018). Ácidos fenólicos são encontrados nos cotilédones, enquanto que flavonoides são encontrados no tegumento (CHÁVEZ-MENDOZA; SÁNCHEZ, 2017; YANG et al., 2018). De acordo com Yang et al. (2018), 28 ácidos fenólicos e 53 flavonoides foram identificados em feijões comuns, enquanto que para as proantocianidinas os estudos de identificação ainda são escassos, apesar de serem os principais polifenóis dessa leguminosa.

Os compostos fenólicos presentes no feijão possuem a capacidade de restringir o desenvolvimento de espécies radicais livres o que lhes confere atividade antioxidante (YANG et al., 2018). Essa característica está relacionada a vários efeitos benéficos na saúde humana como atividades anti-inflamatória e antidiabética, dentre outras (YANG et

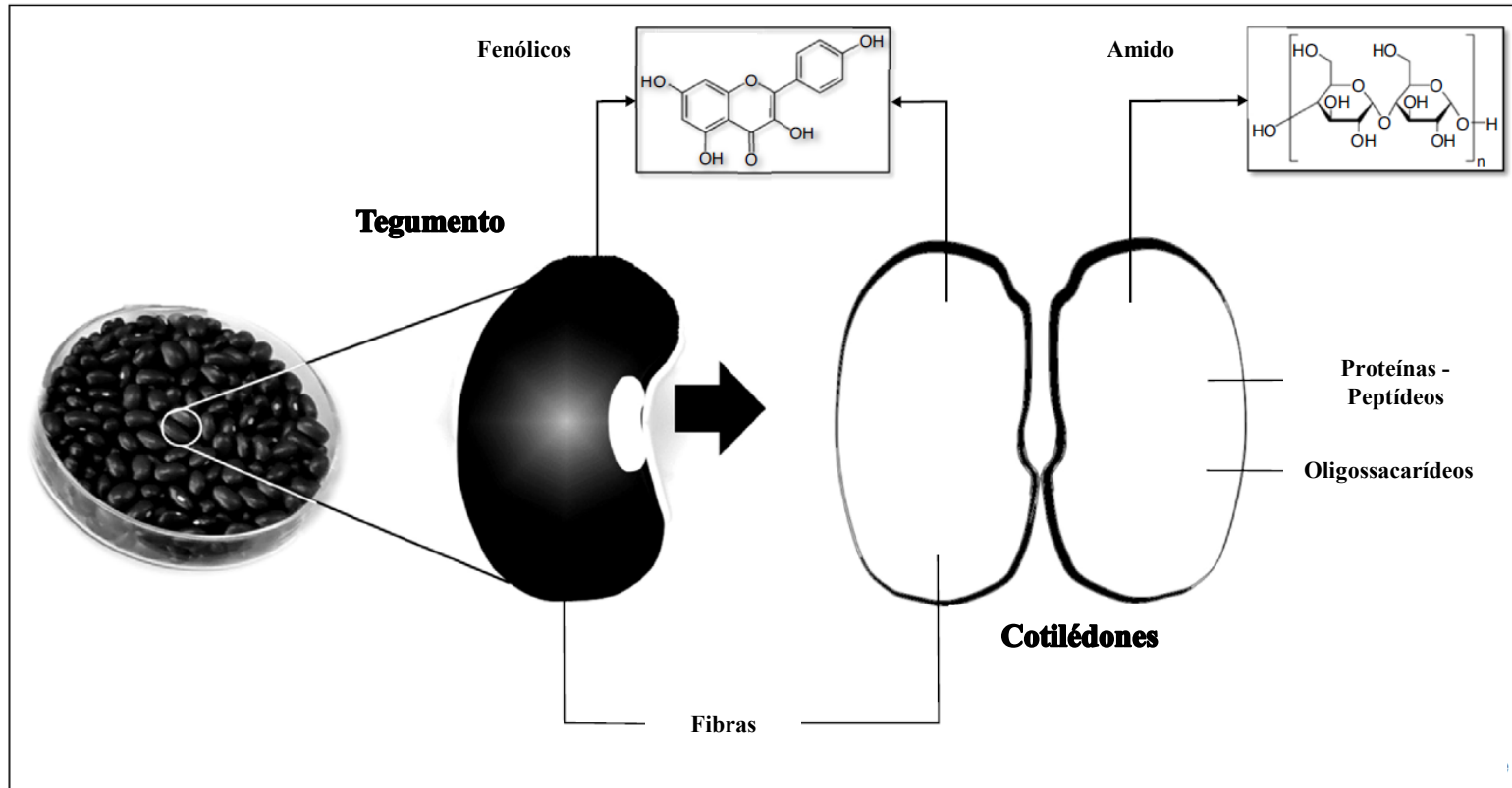
al., 2018). De acordo com Chávez-Mendoza e Sánchez. (2017) a cor do tegumento está altamente relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos e os feijões de cor escura, conseqüentemente, possuem maior capacidade antioxidante. No estudo realizado por Gan et al. (2016) foram investigados a composição fenólica e os efeitos antioxidantes e antibacterianos de 28 extratos pigmentados de tegumentos de diferentes espécies de leguminosas, incluindo *Phaseolus vulgaris*. Esses autores destacaram que os resultados obtidos indicaram que o tegumento pigmentado de feijão teve um efeito antioxidante muito maior do que a maioria das frutas, vegetais, flores, macro-fungos comestíveis e grãos de cereais avaliados por esses mesmos métodos, sugerindo que revestimentos de feijões podem ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais.

Além dos compostos fenólicos, os peptídeos presentes no feijão comum têm sido objeto de diversos estudos. Peptídeos bioativos são liberados durante a hidrólise de proteínas e possuem cerca de 2 a 20 aminoácidos que apresentam tanto benefícios nutricionais quanto potenciais funções fisiológicas (LUNA-VITAL et al., 2015). Alguns estudos demonstram que os peptídeos de feijão inibem enzimas relacionadas a doenças importantes como diabetes tipo 2 e hipertensão (LOS et al., 2018). A geração de peptídeos bioativos a partir de proteínas do feijão comum é realizada através do uso combinado de enzimas do trato gastrointestinal, como pepsina e pancreatina, ou então através da combinação de enzimas com diferentes atividades e especificidades (LUNA-VITAL et al., 2015). Os peptídeos resultantes desses processos possuem propriedades antioxidantes, que além de contribuir para a defesa do organismo, podem atuar sinergicamente com antioxidantes não peptídicos, ocasionando um aumento no seu efeito protetor e também na preservação de alimentos, como uma alternativa ao uso de antioxidantes sintéticos (LUNA-VITAL et al., 2015). Sua bioatividade pode ser atribuída à presença de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe) e básicos (His, Arg), que atuam para manter a estabilidade molecular; ou então pela presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, no terminal N, como Val, Leu, Ile ou Ala, que contribuem para sua atividade antioxidante (MOJICA; DE MEJÍA, 2015; LUNA-VITAL et al., 2015). No estudo realizado por Mojica e de Mejía. (2016) os autores otimizaram a produção de peptídeos bioativos a partir de isolados proteicos de feijão comum preto e determinaram seu potencial biológico. Esses autores conseguiram demonstrar resultados significantes com relação às ações antioxidante e antidiabética e às propriedades potenciais anti-hipertensivas nos isolados após a simulação gastrointestinal e nos seus peptídeos puros.

De acordo com Yang et al. (2018) a atividade antioxidante do feijão comum é resultado da mistura de fitoquímicos que podem exibir efeito sinérgico com outros compostos bioativos presentes no feijão. Além disso, diversos fatores podem influenciar no conteúdo desses compostos como métodos de processamento e armazenamento e fatores genéticos e ambientais (HAYAT et al., 2014; LOS et al., 2018; YANG et al., 2018).

A Figura 2 demonstra a localização de polifenóis e peptídeos nas sementes de feijão comum.

Figura 2. Localização de polifenóis e peptídeos em sementes de feijão comum.



Fonte: Adaptado de LOS et al. (2018).

1.5 Processamento do feijão comum

Grãos de leguminosas, como o feijão comum, geralmente são submetidos ao cozimento antes do seu consumo. Esse processo se faz necessário para tornar o grão palatável com aroma, sabor e textura adequados (BROUGHTON et al., 2003; WOOD, 2017). O cozimento melhora a digestibilidade de proteínas e amido, constituintes majoritários dessa leguminosa, além de inativar compostos antinutricionais (BROUGHTON et al., 2003). O tempo de cozimento é um dos fatores avaliados nos programas de melhoramento e está relacionado com a redução no consumo de feijão e sua substituição por alimentos com menor valor nutricional (SIQUEIRA et al., 2013; SCHOENINGER et al., 2014). De acordo com Wood. (2017), as etapas que ocorrem durante os diferentes tipos de cozimento para grãos de leguminosas podem ser resumidas em pré-imersão; transferência de calor; gelatinização do amido e desnaturação proteica em diferentes temperaturas. No caso de compostos bioativos, a utilização do processamento térmico, por exemplo, parece afetar o conteúdo de fenólicos (CHÁVEZ-MENDOZA; SÁNCHEZ, 2017); no entanto, diferentes cultivares de feijão comum podem apresentar tanto redução quanto aumento na atividade antioxidante de polifenóis após esse processo (YANG et al., 2018). Já na obtenção de peptídeos, esse mesmo processo beneficia a hidrólise devido à exposição dos resíduos hidrofóbicos de proteínas globulares, como a faseolina; contudo, essas proteínas apresentam diferentes susceptibilidades a hidrólise enzimática, dependendo da cultivar (LUNA-VITAL et al., 2015).

Como uma alternativa aos possíveis efeitos do cozimento nos fitoquímicos de leguminosas, a germinação tem sido muito estudada (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2017). A germinação de sementes é um processo conhecido e eficaz de melhoria na qualidade nutricional de leguminosas (MENDOZA-SANCHEZ et al., 2016). Esse processo diminui o nível de fatores antinutricionais e tem sido sugerido como estratégia para elevar a capacidade antioxidante, contudo, a composição e o conteúdo dos compostos fenólicos dependem das condições de germinação e do tipo de leguminosa (DUENAS et al., 2016). Em sementes germinadas, observa-se um aumento no nível de vitaminas, minerais e outros fitoquímicos e um acúmulo de aminoácidos livres e carboidratos solúveis devido à hidrólise de polissacarídeos e proteínas em moléculas menores que fornecem energia e sintetizam substratos para os estágios iniciais de germinação da semente (GU et al., 2017). De acordo com Gan et al. (2017), a germinação pode ser realizada através de três etapas simples: a desinfecção, a embebição e a germinação em si. Essas etapas, são consideradas de baixo custo e eficazes tanto na contribuição do aumento

nutricional como também na diminuição de fatores antinutricionais, como inibidores de proteases e lectinas.

Souza-Rocha et al. (2015) determinaram a capacidade antioxidante de concentrados proteicos de feijão comum germinados por 0h, 24h, 48h e 72h. Os autores observaram que o processo de germinação aumentou a capacidade antioxidante em comparação com as amostras não germinadas e que esse aumento foi considerável em 24h de germinação. Isso foi atribuído a ação das endopeptidases nas proteínas de armazenamento durante os estágios iniciais da germinação, o que pode ter gerado peptídeos com propriedades antioxidantes. No entanto, após 48h de germinação houve uma redução da capacidade antioxidante em comparação com 24h.

Mojica, Chen e de Mejía. (2015) avaliaram o impacto do pré-cozimento nas propriedades bioativas dos peptídeos liberados, após simulação gastrointestinal em cinco variedades de feijão comum. Os autores observaram um aumento na capacidade antioxidante nas amostras pré-cozidas para dois dos cinco feijões analisados, em comparação com as amostras cruas.

Duenas et al. (2016) avaliaram o impacto do cozimento e da germinação na composição fenólica e nas frações de fibra dietética em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e lentilhas (*Lens culinaris* L.) observando que os dois processos resultaram em mudanças positivas como aumento no teor de fibras solúveis e insolúveis em brotos de feijão e em feijões cozidos e aumento geral na concentração fenólica total em fibra alimentar insolúvel em ambas as leguminosas.

Xue et al. (2016) avaliaram os compostos bioativos e atividade antioxidante de três leguminosas popularmente conhecidas, feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão Mungo (*Vigna radiata* L.) e soja (*Glycine max* L.) para entender o efeito da germinação sobre esses compostos e o tempo de germinação considerado ótimo. Esses autores observaram que sementes germinadas são fontes valiosas de compostos bioativos naturais e antioxidantes. Também observaram que o melhor período de germinação de sementes para as três leguminosas analisadas foi de 3 a 5 dias quando o teor de compostos bioativos e atividade antioxidante atingiram seus valores máximos.

Huber et al. (2016) avaliaram o impacto do processamento térmico precedido ou não por imersão nos perfis e conteúdo de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de feijão comum marrom. A atividade antioxidante foi medida por dois métodos espectrofotométricos e os autores observaram que para um dos métodos a atividade antioxidante aumentou após o tratamento térmico com ou sem imersão em comparação com as amostras cruas.

Mendoza-Sanchez et al. (2016) determinaram o efeito de elicitores em diferentes concentrações sobre o conteúdo de compostos antinutricionais e nutracêuticos e sobre a capacidade antioxidante de brotos de *Phaseolus vulgaris* L. Esses autores observaram uma diminuição nos antinutrientes e um aumento nos compostos fenólicos e capacidade antioxidante, além disso, constataram que os elicitores melhoraram a porcentagem de germinação e o tamanho de raiz dos brotos.

2 ANÁLISE PROTEÔMICA

As proteínas são extremamente importantes, pois desempenham um papel crucial em quase todos os processos biológicos (GALLARDO; MORTEA, 2013). O termo “proteômica” refere-se ao estudo do “proteoma”, o conjunto de proteínas expresso pelo genoma de um organismo ou tecido, em um momento específico (JORRIN-NOVO et al., 2015; WILKINS et al., 1996); refletindo o contexto de um sistema biológico particular, que é extremamente dinâmico e variável, em resposta a diferentes estímulos, estresses ou doenças (DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012). Seu estudo permite a visualização, comparação e identificação de muitas proteínas em um único experimento e inclui a quantificação de proteínas, interações proteína-proteína, modificações pós-traducionais (PTMs) e funcionais (DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012).

Muitas metodologias são utilizadas para estudar as proteínas em larga escala, porém, em termos de rendimento e sensibilidade as abordagens baseadas na espectrometria de massas (MS) são mais adequadas (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014). Atualmente três estratégias baseadas em MS são utilizadas em proteômica: *bottom-up*, *top-down*, e *middle-down* (ZHANG et al., 2013).

Tradicionalmente, a proteômica tem sido realizada pela abordagem *bottom-up*, ou de baixo para cima, onde ocorre a digestão química ou enzimática da proteína antes da sua introdução no espectrômetro de massa (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014). Já a estratégia *top-down*, ou de cima para baixo, é utilizada para caracterizar proteínas intactas e seus íons de fragmentação, gerados dentro do espectrômetro de massa, sem digestão prévia (CUNSOLO et al., 2014). E na proteômica *middle-down* os fragmentos de peptídeos maiores são analisados minimizando a redundância peptídica entre proteínas (ZHANG et al., 2013).

Segundo Jorrin-Novo et al. (2015), as diferentes estratégias utilizadas na análise proteômica resultam das diferentes combinações de protocolos e devem conter em sua maioria: desenho experimental; preparação da amostra; extração, purificação e digestão das proteínas; análise por MS; identificação; análise estatística e validação da identificação (Figura 3).

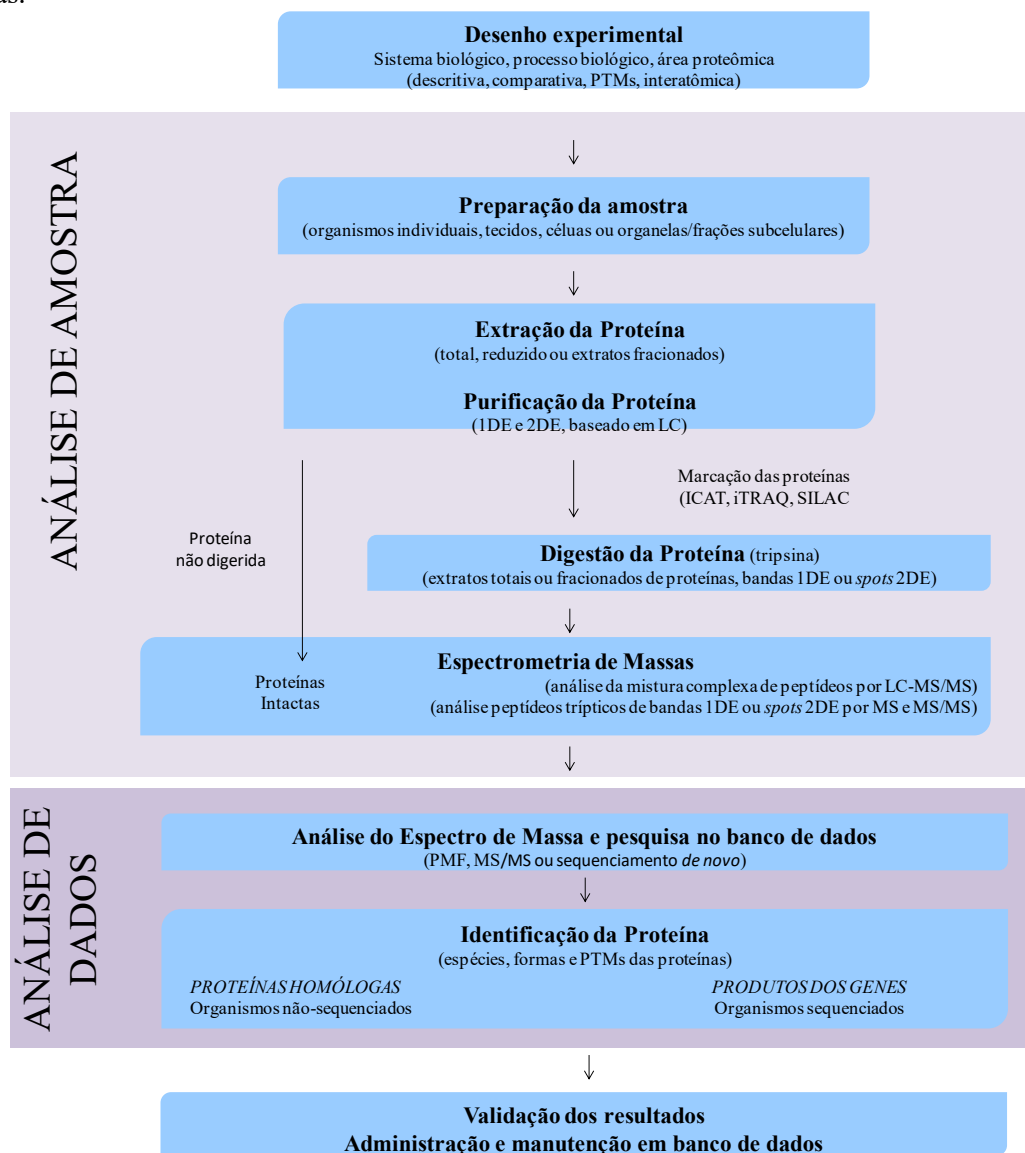
As proteínas são extremamente importantes, pois desempenham um papel crucial em quase todos os processos biológicos (GALLARDO; MORTEA, 2013). O termo “proteômica” refere-se ao estudo do “proteoma”, o conjunto de proteínas expresso pelo genoma de um organismo ou tecido, em um momento específico (JORRIN-NOVO et al., 2015; WILKINS et al., 1996); refletindo o contexto de um sistema biológico particular, que é extremamente dinâmico e variável, em resposta a diferentes estímulos, estresses ou doenças (DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012). Seu estudo permite a visualização, comparação e identificação de muitas proteínas em um único experimento e inclui a quantificação de proteínas, interações proteína-proteína, modificações pós-traducionais (PTMs) e funcionais (DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012).

Muitas metodologias são utilizadas para estudar as proteínas em larga escala, porém, em termos de rendimento e sensibilidade as abordagens baseadas na espectrometria de massas (MS) são mais adequadas (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014). Atualmente três estratégias baseadas em MS são utilizadas em proteômica: *bottom-up*, *top-down*, e *middle-down* (ZHANG et al., 2013).

Tradicionalmente, a proteômica tem sido realizada pela abordagem *bottom-up*, ou de baixo para cima, onde ocorre a digestão química ou enzimática da proteína antes da sua introdução no espectrômetro de massa (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014). Já a estratégia *top-down*, ou de cima para baixo, é utilizada para caracterizar proteínas intactas e seus íons de fragmentação, gerados dentro do espectrômetro de massa, sem digestão prévia (CUNSOLO et al., 2014). E na proteômica *middle-down* os fragmentos de peptídeos maiores são analisados minimizando a redundância peptídica entre proteínas (ZHANG et al., 2013).

Segundo Jorrin-Novo et al. (2015), as diferentes estratégias utilizadas na análise proteômica resultam das diferentes combinações de protocolos e devem conter em sua maioria: desenho experimental; preparação da amostra; extração, purificação e digestão das proteínas; análise por MS; identificação; análise estatística e validação da identificação (Figura 3).

Figura 3. Etapas normalmente realizadas na Análise Proteômica baseadas nas diferentes estratégias utilizadas.



Fonte: Adaptado de Jorrín-Novo et al. (2015).

O desenho experimental, embora não seja considerado parte de um protocolo, é a base para a interpretação correta dos resultados (JORRIN-NOVO et al., 2015) e as etapas de preparação da amostra e extração das proteínas são críticas e essenciais, pois o proteoma de um organismo, célula ou tecido possui alta complexidade (AGRAWAL et al., 2013). Assim, essas etapas são fundamentais para uma separação bem-sucedida e conseqüentemente, uma boa identificação das proteínas (AGRAWAL et al., 2013).

O método de separação é escolhido conforme o âmbito da investigação e tem o poder de simplificar amostras biológicas complexas (CUNSOLO et al., 2014; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). A espectrometria de massas para proteínas é altamente dependente desses métodos que podem ser realizados por eletroforese em gel ou métodos baseados em

cromatografia líquida (CUNSOLO et al., 2014). Dentre os métodos de separação, a eletroforese bidimensional (2-DE) tem sido utilizada, pois fornece dados quantitativos e qualitativos sobre as proteínas (WANG et al., 2015). Esta técnica tornou-se importante na análise proteômica, pois permite a separação de centenas de proteínas intactas em um único gel baseado na massa molar e carga iônica (ZHANG et al., 2013).

2.1 Separação das proteínas por 2-DE

A separação das proteínas por 2-DE baseia-se no conceito de que moléculas que possuem cargas migram em uma solução, em função da aplicação de um campo elétrico (GORG; WEISS; DUNN, 2004). Entre suas vantagens, destaca-se a alta resolução obtida na separação (RABILLOUD et al., 2010). O objetivo da 2-DE é separar proteínas desnaturadas de acordo com seu ponto isoelétrico e sua massa molar, resultando em uma metodologia completa, que fornece informações qualitativas e quantitativas de proteínas intactas e uma visão geral de suas diferentes isoformas e modificações pós-traducionais (GORG; WEISS; DUNN, 2004).

Dessa forma, as proteínas são separadas em duas dimensões. A primeira dimensão é a focalização isoelétrica (IEF), que é o procedimento utilizado para separar as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). A IEF separa as proteínas em uma matriz contendo anfóteros que formam um gradiente de pH e, pela passagem de corrente, as proteínas migram até obter carga líquida zero (pH que equivale ao pI da proteína); então, as proteínas com pI distintos são separadas diferentemente ao longo da matriz. A segunda dimensão, eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), é realizada em um gel de poliacrilamida na presença do dodecil sulfato de sódio (SDS) que é um detergente anfipático com função de desnaturar as proteínas, deixando-as com estrutura linear e conferindo densidade de carga uniforme para que elas possam ser separadas com base em sua massa molar. As proteínas separadas anteriormente na IEF são aplicadas no topo do gel de poliacrilamida-SDS e submetidas a uma corrente elétrica, fazendo com que elas migrem na malha de acrilamida em direção ao pólo positivo (GORG; WEISS; DUNN, 2004).

Através da eletroforese bidimensional, diferenças no proteoma podem ser detectadas por comparação entre géis (ROGOWSKA-WRZESINSKA et al., 2013). Além disso, esta técnica pode resolver misturas complexas de proteínas, separando proteínas de massa molar idêntica que diferem nos seus valores de pI ou então proteínas de pI semelhantes que apresentam massas molares distintas.

Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel devem ser coradas para que possam ser detectadas. Uma das metodologias de coloração mais utilizadas é o azul brilhante de Coomassie coloidal que é compatível com a espectrometria de massas, embora seja menos sensível do que colorações com nitrato de prata (THIELLEMENT, 2006; ZHANG et al., 2013).

Com a coloração é possível visualizar *spots*, proteínas presentes no gel, que depois de corados são digitalizados com o auxílio de um scanner e analisados através de um programa de computador que disponibiliza diversos recursos como a contagem do número de *spots* e análise dos níveis de expressão (GORG; WEISS; DUNN, 2004). A análise de imagem dos géis bidimensionais é uma etapa importante na proteômica, gerando grande quantidade de dados qualitativos e quantitativos, por isso, é necessário a utilização de um programa de computador. Através das imagens é possível obter resultados relativos à comparação entre os géis e requer um trabalho minucioso do analista para a detecção de alterações inerentes à técnica como as diferenças de coloração e a concentração relativa de cada *spot* (STESSI; NOE; LACHMANN, 2009).

Para que se tenha uma boa reprodutibilidade nos experimentos em que se utiliza como método de separação a 2-DE, é importante incluir replicatas técnicas e biológicas uma vez que a variabilidade biológica é uma característica natural de todos os organismos e as repetições técnicas possibilitam medir as possíveis variações experimentais existentes comparando-as com a variação biológica das amostras em estudo (DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012).

2.2 Espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas é definida como uma técnica analítica que tem por objetivo separar e quantificar íons em função de sua relação entre massa e carga (m/z) por meio de um espectrômetro de massa que mede as espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD; MANN, 2003; DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012). Essa técnica revolucionou a análise de biomoléculas no final dos anos 80 com o desenvolvimento de dois novos métodos de ionização ESI (*Electrospray*) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), capazes de ionizar compostos não voláteis e polares como DNA, proteínas e carboidratos (CUNSOLO et al., 2014).

Antes da realização da espectrometria de massas os *spots* de interesse são selecionados, excisados dos géis 2-DE e digeridos com uma enzima específica (AEBERSOLD; MANN, 2003). A enzima mais comumente utilizada na etapa de digestão é a tripsina que cliva proteínas na porção C-terminal após resíduos de Arginina e Lisina, gerando peptídeos de tamanho apropriado para a análise de espectrometria de massas (MENA; ALBAR, 2013). Este método onde primeiramente as proteínas são separadas por 2-DE e então convertidas em peptídeos pela ação da tripsina com posterior análise por MS é denominado *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) e fornece uma impressão digital dos fragmentos de peptídeos presentes, permitindo em muitos casos a identificação das proteínas (DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012).

Após a digestão, os peptídeos são misturados a uma matriz acidificada ocorrendo a co-cristalização de ambos e a placa contendo a matriz e o analito co-cristalizados é introduzida no espectrômetro de massas (CANTÚ *et al.*, 2008). A fonte de íons (MALDI) ioniza e transfere as proteínas ou peptídeos para a fase gasosa (AEBERSOLD; MANN, 2003; CANTÚ *et al.*, 2008). Para isso, a matriz co-cristalizada absorve a energia do raio laser incidido sobre ela e transfere-a para o analito acidificado fazendo com que esse analito seja levado à fase gasosa e ionizado, ao mesmo tempo em que a matriz é dessorvida devido ao aquecimento rápido do laser (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). Normalmente, essa fonte de íons é acoplada a analisadores TOF (*time-of-flight* ou tempo de voo), que medem a relação entre a massa e a carga dos analitos ionizados (AEBERSOLD; MANN, 2003), através do uso das diferentes velocidades assumidas por esses íons que são dependentes das suas massas. Os analisadores podem atuar também acoplados entre si, denominados “MALDI TOF-TOF” (AEBERSOLD; MANN, 2003) permitindo a realização de experimentos em sequência (tandem), com detecção de um determinado íon que depois pode ser fragmentado (MS/MS) (CANTÚ *et al.*, 2008) e comparado

com o íon precursor, resultando no aumento da certeza da identificação (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

Posteriormente à passagem pelo analisador de massas, os espectros obtidos de íons precursores (MS) e/ou espectros de íons dos produtos (MS/MS) são detectados e analisados por um software específico para identificação das proteínas (DIZ; MARTINEZ-FERNANDEZ; ROLAN-ALVAREZ, 2012). Os softwares mais utilizados são o Sequest ou o Mascot, os quais permitem identificar as proteínas através da correlação dos espectros de massas não interpretados com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em banco de dados (CANTÚ et al., 2008).

Devido ao número crescente de genomas sendo sequenciados e publicados, a proteômica tem assumido a liderança na investigação biológica vegetal. Mapas proteicos para vários tecidos em leguminosas-modelo, como a soja, já estão disponíveis e podem apoiar substancialmente abordagens comparativas de proteômica (RAMALINGAM et al., 2015) como no estudo realizado por Min et al. (2015) que estabeleceram o proteoma de sementes de duas cultivares de soja (*Glycine max*) e duas variedades de soja selvagem (*Glycine soja*). O objetivo dos autores foi melhorar a compreensão sobre a diferença no teor de proteínas em sementes de soja uma vez que os programas de melhoramento necessitam compreender os mecanismos bioquímicos subjacentes ao acúmulo de proteínas para obtenção de resultados bem sucedidos. Foram utilizados nesse estudo a 2-DE como método de separação e MALDI TOF/TOF MS para identificação das proteínas presentes. Um total de 1045 e 1144 *spots* foram observados nas duas cultivares de soja e destes, 71 *spots* diferencialmente expressos foram identificados; enquanto que nas variedades de soja selvagem 989 e 1074 *spots* foram detectados com 53 *spots* diferencialmente expressos identificados.

2.3 Proteômica de feijão comum

Nos últimos anos, estudos sobre o proteoma do feijão comum investigaram questões relacionadas à sua diversidade, resposta a estresses bióticos e abióticos e proteínas de armazenamento do grão (ZARGAR et al., 2015). Esses estudos avaliaram as proteínas de grãos (BALSAMO et al., 2015; DE LA FUENTE et al., 2012; LOPEZ-PEDROUSO; ALONSO; ZAPATA, 2014; LOPEZ-PEDROUSO et al., 2014; MARSOLAIS et al., 2010; NATARAJAN et al., 2013), das raízes (BADOWIEC; WEIDNER, 2014) e de folhas (VALENTIM-NETO et al., 2016; ZADRAZNIK et al., 2013).

O trabalho pioneiro sobre o proteoma do grão de feijão avaliou a deficiência nas proteínas de reserva em genótipos selvagem e mutante, observando que no genótipo mutante ocorreu um aumento nas proteínas contendo aminoácidos sulfurados (MARSOLAIS et al., 2010). Posteriormente, três diferentes protocolos de extração de proteínas foram comparados, uma vez que este é um passo fundamental para obter proteoma abrangente e representativo (DE LA FUENTE et al., 2011). Em 2012, uma descrição detalhada da diversidade da faseolina em grãos de cultivares de diferentes origens geográficas utilizando eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massas foi publicada (DE LA FUENTE et al., 2012). O proteoma de uma variedade selvagem do México foi avaliado e 141 proteínas foram identificadas por espectrometria de massas (NATARAJAN et al., 2013). Perfis de faseolina em 2-DE foram comparados entre dezoito cultivares para verificar se os mesmos poderiam ser utilizados como marcadores moleculares do grau de divergência genética e da qualidade dessa proteína de semente em populações de feijão (LOPEZ-PEDROUSO et al., 2014b). O mesmo autor explorou a presença e a dinâmica de isoformas de faseolinas fosforiladas durante a germinação (LOPEZ-PEDROUSO et al., 2014). Balsamo et al. (2015) compararam o perfil de proteínas de duas variedades do feijão geneticamente modificado (GM) Embrapa 5.1 com suas contrapartes não GM, fornecendo a primeira proteômica de grãos desse feijão. Parreira et al. (2016) avaliaram as proteínas expressas durante o desenvolvimento da semente através da proteômica de alto rendimento livre de gel (LC-MS / MS) destacando a diversidade de processos moleculares que vão desde a embriogênese tardia até a dessecação da semente. Mais de 400 proteínas diferencialmente acumuladas foram identificadas e seus perfis de abundância relativa ao longo do desenvolvimento da semente foram descritos.

3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

Como a análise proteômica gera uma grande quantidade de dados, muitos pesquisadores recomendam que se tratem os dados de proteômica simultaneamente por meios de estatística multivariada (GOTTLIEB et al., 2004; GROVE et al., 2008). Segundo Gottlieb et al. (2004) além de identificar as proteínas de interesse, também é importante explicar a relação global entre as mesmas.

A análise de componentes principais (PCA) permite resumir as informações das variáveis de entrada em número menor de variáveis, denominadas componentes principais (CP) (GLEASON et al., 2015). Essa análise gera o mesmo número de componentes principais que as variáveis de entrada e cada um deles explica em ordem decrescente a quantidade de variação entre os dados (GLEASON et al., 2015). O primeiro componente principal é a combinação linear que explica a quantidade máxima da variância total através de todas as variáveis de entrada e o segundo componente principal explica a quantidade máxima de qualquer variação restante nas variáveis de entrada não explicadas pelo primeiro componente principal e assim sucessivamente (GLEASON et al., 2015).

Proteômica e PCA aplicados para cultivares brasileiras de feijão comum foram realizados por Valentim-Neto et al. (2016) e Balsamo et al. (2015), que avaliaram o proteoma de folha e grão, respectivamente, de duas diferentes variedades brasileiras de feijão comum geneticamente modificadas (GM) comparando-as com suas contrapartes não-GM, e por Mojica e de Mejia (2015) que caracterizaram e compararam o perfil de proteínas de doze cultivares de feijoeiro comum cultivadas no México e de três cultivares do tipo carioca, cultivadas no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 422:198-207, 2003.
- AGRAWAL, G. K. et al. A decade of plant proteomics and mass spectrometry: Translation of technical advancements to food security and safety issues. **Mass Spectrometry Reviews**, 32:335-365, 2013.
- ANGIOLILLO, L; DEL NOBILE, M. A; Conte, A. The extraction of bioactive compounds from food residues using microwaves. **Current Opinion in Food Science**, 5:93–98, 2015.
- ASSEFA, T. et al. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Mol Breeding**, 39: 20, 2019.
- BALSAMO, G. M. et al. Comparative Proteomic Analysis of Two Varieties of Genetically Modified (GM) Embrapa 5.1 Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Non-GM Counterparts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63:10569-10577, 2015.
- BADOWIEC, A; WEIDNER, S. Proteomic changes in the roots of germinating *Phaseolus vulgaris* seeds in response to chilling stress and post-stress recovery. **Journal of Plant Physiology**, 171:389-398, 2014.
- BITOCCHI, E. et al. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 109:E788-E796, 2012.
- BRASIL. Instrução normativa nº 12, de 28 de março de 2008. Regulamento técnico do feijão. D.O.U. Diário Oficial da União, Brasília, 31 de março de 2008.
- BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, 252:55-128, 2003.
- BURLE, M. L. et al. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:801-813, 2010.
- CANTÚ, M. D. et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, 31:669-675, 2008.
- CARRASCO-CASTILLA, J. et al. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. **Food Chemistry**, 131:1157-1164, 2012.
- CARVALHO, J. V. et al. Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV051-1) with its non-transgenic counterpart. **Transgenic Research**, 1-7, 2015.

CATHERMAN, A. D; SKINNER, O. S; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 445:683-693, 2014.

CHÁVEZ-MENDOZA, C; SÁNCHEZ, E. Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. **Molecules**, 22:1360, 2017.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quarto levantamento, Janeiro 2020**. Brasília: Conab, 2020.

CUNSOLO, V. et al. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. **Journal of Mass Spectrometry**, 49:768-784, 2014.

DE FARIA, L. C et al. 'BRS Vereda': new common bean cultivar of the "Rosinha" commercial grain type. **Crop breeding and Applied Biotechnology**, 4:264-266, 2004.

DE FARIA, L. C. et al. Genetic progress during 22 years of improvement of carioca-type common bean in Brazil. **Field Crops Research**, 142:68-74, 2013.

DE FARIA, L. C. Genetic progress during 22 years of black bean improvement. **Euphytica**, 199: 261–272, 2014.

DE LA FUENTE, M. et al. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Proteomics**, 74:262-267, 2011.

DE LA FUENTE M. et al. In-Depth Characterization of the Phaseolin Protein Diversity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Based on Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Food Technology and Biotechnology** 50:315-325, 2012.

DIZ, A; MARTINEZ-FERNANDEZ, M; ROLAN-ALVAREZ, E. Proteomics in evolutionary ecology: linking the genotype with the phenotype. **Molecular Ecology**, 21:1060-1080, 2012.

DUENAS, M. et al. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.) **Lwt-Food Science and Technology**, 66:72-78, 2016.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, 77:67-82, 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Vereda: Nova Cultivar de Feijoeiro Comum do grupo comercial rosinha para o Distrito Federal**. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF, 2003.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**, 2012.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. faostat.fao.org/Acesso em: 04/12/2019.

FIESP. **Outlook Brasil 2022 - projeções para o agronegócio** / Federação das Indústrias do Estado de São Paulo, Instituto de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais. – São Paulo: FIESP/ICONE, 132 p, 2012.

GALLARDO, J. M; MORTEA, I. Proteomics in Food Science. In: Foodomics: Advanced Mass Spectrometry in Modern Food Science and Nutrition. **Wiley**, p.125-152, 2013.

GAN, R-Y. et al. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. **Trends in Food Science & Technology**, 59: 1-14, 2017.

GLEASON, P. M. et al. Publishing Nutrition Research: A Review of Multivariate Techniques-Part 3: Data Reduction Methods. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, 115:1072-1082, 2015.

GORG, A; WEISS, W; DUNN, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, 4:3665-3685, 2004.

GOTTLIEB, D. M. et al. Multivariate approaches in plant science. **Phytochemistry**, 65:1531-1548, 2004.

GROVE, H. et al. Combination of Statistical Approaches for Analysis of 2-DE Data Gives Complementary Results. **Journal of Proteome Research**, 7:5119-5124, 2008.

GU, E. J. et al. Mass-based metabolomic analysis of soybean sprouts during germination. **Food Chemistry**, 217:311-319, 2017.

HAYAT, I. et al. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 54: 580-592, 2014.

HUBER, K. et al. Phenolic Acid, Flavonoids and Antioxidant Activity of Common Brown Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and After Cooking. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, 6: 1-7, 2016.

JORRIN-NOVO, J. V. et al. Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. **Proteomics** 15:1089-1112, 2015.

KANG, Y. J et al. Genome sequence of mung bean and insights into evolution within Vigna species. **Nature Communications**, 2014.

KOO, S. C. et al. Biochemical and proteomic analysis of soybean sprouts at different germination temperatures. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 58:397-407, 2015.

KRUPA, U. Main nutritional and antinutritional compounds of bean seeds - A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, 58:149-155, 2008.

LAJOLO, F. M. et al. **Qualidade Nutricional. In: Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba:PATAFOS, p 223-262, 1996.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X. et al. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. **Journal of functional foods**, 38: 624-634, 2017.

LOPEZ-PEDROUSO, M; ALONSO, J; ZAPATA, C. Evidence for phosphorylation of the major seed storage protein of the common bean and its phosphorylation-dependent degradation during germination. **Plant Molecular Biology**, 84:415-428, 2014.

LOPEZ-PEDROUSO, M. et al. Evaluating Two-Dimensional Electrophoresis Profiles of the Protein Phaseolin as Markers of Genetic Differentiation and Seed Protein Quality in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62:7200-7208, 2014.

LOS, F. G. B. et al. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. **Current opinion in food science**, 19:63-71, 2018.

LUNA-VITAL, D. A. et al. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. **Food Research International**, 76: 39–50, 2015.

MAMIDI, S. et al. Demographic factors shaped diversity in the two gene pools of wild common bean *Phaseolus vulgaris* L. **Heredity**, 110:267-276, 2013.

MARSOLAIS, F. et al. Proteomic analysis of common bean seed with storage protein deficiency reveals up-regulation of sulfur-rich proteins and starch and raffinose metabolic enzymes, and down-regulation of the secretory pathway. **Journal of Proteomics**, 73:1587-1600, 2010.

MELO, L. C. et al. BRS Estilo - Common bean cultivar with Carioca grain, upright growth and high yield potential. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 10:377-379, 2010.

MELO, L. C. et al. Common bean cultivar BRS Ametista with large Carioca grains and disease resistance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 12:293-296, 2012.

MENA, M. C; ALBAR, J. P. Next Generation Instruments and Methods for Proteomics. In: Foodomics: Advanced Mass Spectrometry in Modern Food Science and Nutrition. **WILEY**, p. 15-55, 2003.

MENDOZA-SANCHEZ, M. et al. Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. **Food Chemistry**, 212:128-137, 2016.

MEZIADI, C. et al. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, 242:351-357, 2016.

MIN, C. W. et al. Comparative Biochemical and Proteomic Analyses of Soybean Seed Cultivars Differing in Protein and Oil Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63:7134-7142, 2015.

MOJICA, L; CHEN, K; DE MEJÍA, E. G. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. **Journal of Food Science**, 80: H188-H198, 2015.

MOJICA, L; DE MEJIA, E. G. Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. **Plant Foods for Human Nutrition** 70:105-112, 2015.

MOJICA, L; DE MEJÍA, E. G. Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. **Food & Function**, 7, 713–727, 2016.

MONTOYA, C. A. et al. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, 43:443-449, 2010.

MOUSAVI-DERAZMAHALLEH, M. et al. Adapting legume crops to climate change using genomic approaches. **Plant Cell Environ**, 42:6–19, 2019.

MUÑOZ, N. et al. Potential Uses of Wild Germplasms of Grain Legumes for Crop Improvement, **International Journal of Molecular Sciences**, 18: 328, 2017.

NATARAJAN, S. S. et al. Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Journal of Basic & Applied Sciences**, 9:424-437, 2013.

NUNES, J. V. D. et al. Comparison among beans species for food sprouts yield. **Bioscience Journal**, 31:1682-1691, 2015.

PARREIRA, J. R. et al. Differential proteomics reveals the hallmarks of seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Journal of Proteomics**, 143:188-198, 2016.

PEREIRA, H. S. et al. BRS Esteio - Common bean cultivar with black grain, high yield potential and moderate resistance to anthracnose. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 13: 373-376 2013.

RAMALINGAM, A. et al. Proteomics and Metabolomics: Two Emerging Areas for Legume Improvement. **Frontiers in Plant Science**, 6, 2015.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A. et al. 2D gels still have a niche in proteomics. **Journal of Proteomics**, 88:4-13, 2013.

SATHE, S. K. Dry bean protein functionality. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22:175-223, 2002.

SCHMUTZ, J. et al. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, 46:707-713, 2014.

SCHOENINGER, V. et al. Processing parameter optimization for obtaining dry beans with reduced cooking time. **LWT - Food Science and Technology**, 56: 49-57, 2014.

SIQUEIRA, B. S. et al. Hardness of carioca beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by cooking methods. **LWT - Food Science and Technology**, 54: 13e17, 2013.

SMÝKAL, P. et al. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 34:43-104, 2015.

SOUZA-ROCHA, T. et al. Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes in vitro. **Food research international**, 76:150-159, 2015.

STESSI, M; NOE, C; LACHMANN, B. Influence of image-analysis software on quantitation of two-dimensional gel electrophoresis data. **Electrophoresis**, 30:325-328, 2009.

TANG, D. Y. et al. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). *Chemistry Central Journal*, 2014.

THIELLEMENT, H. **Plant proteomics : methods and protocols**. Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ, 2006.

TSUTSUMI, C. Y; BULEGON, L. G; PIANO, J. T. Melhoramento genético do feijoeiro: avanços, perspectivas e novos estudos, no âmbito nacional. **Nativa, Sinop**, 03: 217-223, 2015.

VALENTIM-NETO, P. A. et al. Leaf proteome comparison of two GM common bean varieties and their non-GM counterparts by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96:927-932, 2016.

VLASOVA, A. et al. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome Biology**, 17, 2016.

XUE, Z. H. et al. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mung Bean (*Vigna radiata* L.), Soybean (*Glycine max* L.) and Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the Germination Process. **Czech Journal of Food Sciences**, 34:68-78, 2016.

WANG, W. Q. et al. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, 86:1-15, 2015.

WENDLAND, A. et al. BRS Sublime - Common bean cultivar with carioca grain, resistance to angular leaf spot and high nutritional quality. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 18: 440-445, 2018.

WILKINS, M. et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Bio-Technology**, 14:61-65, 1996.

WOOD, J. A. Evaluation of cooking time in pulses: A review. **Cereal Chemistry**, 94: 32-48, 2017

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 11:49-79, 2009.

YANG, Q. Q. et al. Polyphenols in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, Analysis, and Factors Affecting Composition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 17: 1518-1539, 2018.

ZADRAZNIK, T. et al. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Proteomics** 78:254-272, 2013.

ZHANG, Y. et al. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical Reviews**, 113:2343-2394, 2013.

CAPÍTULO II

***Artigo publicado na Revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**

Gabriela Barbosa Rossi, Pedro Alexandre Valentim-Neto, Martina Blank, Josias Correa de Faria, Ana Carolina Maisonnave Arisi. Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 7588–7597, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03220

Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars

Gabriela Barbosa Rossi,† Pedro Alexandre Valentim-Neto,† Martina Blank,‡ Josias Correa de Faria,§ and Ana Carolina Maisonnave Arisi*

† CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department and ‡ CEBIME UFSC, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianopolis, Santa Catarina, Brazil

§ Embrapa Arroz e Feijao, Caixa Postal 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brazil

Corresponding Author

*E-mail: ana.arisi@ufsc.br. Phone: +554837215382.

ORCID

Ana Carolina Maisonnave Arisi: 0000-0001-6077-7960

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a source of proteins for about one billion people worldwide. In Brazil, 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio', and 'BRS Estilo' cultivars were developed by Embrapa to offer high yield to farmers and excellent quality to final consumers. In this work, grain proteomes of these common bean cultivars were compared based on two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and tandem mass spectrometry (MS/MS). Principal component analysis (PCA) was applied to compare 349 matched spots in these cultivars proteomes, and all cultivars were clearly separated in PCA plot. Thirtytwo differentially accumulated proteins were identified by MS. Storage proteins such as phaseolins, legumins, and lectins were the most abundant, and novel proteins were also identified. We have built a useful platform that could be used to analyze other Brazilian cultivars and genotypes of common beans.

KEYWORDS: *Phaseolus vulgaris*, proteome, 2-DE, MS, PCA

1 INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a source of proteins, complex carbohydrates, vitamins, iron, and calcium for about one-billion people worldwide. It is an important staple food especially in Latin America and Africa.^{1,2} This legume presents benefits in agriculture, due to its ability to fix atmospheric nitrogen,³ as well as in human health, due to its grain composition, rich in soluble fiber, phenolic compounds, saponins, minerals, proteins, and peptides.⁴⁻⁶ Factors such as climate change result in biotic and abiotic stresses in crops including common bean, which lead to a decrease in yield and nutritional status. In this sense, proteomics linked with genomics and transcriptomics will probably improve the agronomic merit and quality traits of common bean.⁷ The complete genome of common bean has become available,¹ and seed proteome has been investigated.⁷⁻¹⁴ The seed proteome profile of phaseolin has been proposed as a marker in common bean genetic improvement.¹⁰ Temporal changes during common bean seed development were recently analyzed to provide a comprehensive seed proteome atlas in an attempt to develop and select new common bean cultivars with desired seed quality traits.¹² Brazil is among the world's leading producers and consumers of common beans. In 2014, the country produced 3.29 million tons of beans,¹⁵ and by 2023, it is estimated that production could increase about 14%.¹⁶ Common bean is cultivated by small and large producers in all Brazilian regions and different cropping systems.¹⁷ This diversity implies a constant search for cultivars that present desirable agronomic characteristics and consumer preferences. From 1984–2010, common bean genetic improvement program coordinated by Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) launched 50 new cultivars in Brazil.¹⁷ 'BRS Sublime', 'BRS Estilo', 'BRS Esteio', and 'BRS Vereda' are Brazilian cultivars developed by Embrapa to offer high yield to farmers and excellent quality to final consumers. 'BRS Sublime' and 'BRS Estilo' belong to the "carioca" grain type, which represents about 70% of the Brazilian production.¹⁸ 'BRS Esteio' is black grain type, the second grain type most consumed in Brazil, and represents 20% of total common bean production;¹⁹ 'BRS Vereda' has pink grain type, different from other commercial classes, released as an alternative for consumers.²⁰ Embrapa has also developed a genetically modified common bean resistant to Bean golden mosaic virus, the event EMB-PV051-1 (Embrapa 5.1), which was approved for commercial cultivation and consumption in Brazil.^{2,21} In this work, we compared by principal component analysis the grain proteome profiles from four Brazilian common bean cultivars, 'BRS Sublime', 'BRS Estilo', 'BRS Esteio', and 'BRS Vereda'. In addition, we were able to identify 32 differentially accumulated proteins among these cultivars.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material.

Four common bean (*P. vulgaris* L.) cultivars ('BRS Sublime', 'BRS Estilo', 'BRS Esteio' and 'BRS Vereda') were cultivated and provided by Embrapa Arroz e Feijao (Rice and Bean Unit). They were grown side by side in a greenhouse from June to August 2015 in Embrapa Arroz e Feijao, Santo Antônio de Goiás, Goiás State, Brazil (GPS 16°30'23.9"S 49°16'59.7"W). Approximately 40 grains of each cultivar (10 g) were ground in liquid nitrogen using an analytical mill (IKA, Staufen, Germany) and stored at -80 °C until protein extraction.

2.2 Protein Extraction.

On the basis of previous established protein extraction method,¹³ three protein extracts were obtained for each cultivar, from 300 mg of ground sample suspended in 0.8 mL of extraction buffer [0.5 M Tris-HCl, pH 8; 0.7 M sucrose; 100 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA); 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF); 1% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)- dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS); 14 mM dithiothreitol (DTT); Roche protease inhibitor (Mannheim, Germany)]. After centrifugation at 20 000 × g for 20 min at 4 °C, 1.6 mL of solution containing pure acetone, 12.5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), and 0.125% (w/v) DTT was added to upper phase and kept overnight at 4 °C. This was followed by centrifugation at 20 000 × g for 20 min at 4 °C. The pellet was washed three times with ice cold methanol, twice with pure acetone, and finally with acetone containing 0.1% (w/v) DTT. After centrifugation at 10 000 × g for 30 min at 4 °C, the upper phase was discarded, and dried protein pellets were suspended in 400 µL of rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 0.28% (w/v) DTT, and 1% (w/v) PMSF. The protein extracts were cleaned using 2-D Clean-Up Kit and protein concentrations were measured using 2-D Quant Kit (both GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

2.3 Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE) Analyses.

The 2-DE analyses were performed as described previously²² with modifications. Immobiline Drystrip gels (IPG strips, 4–7 linear gradient pH, 13 cm) (GE Healthcare) were used for isoelectric focusing (IEF).^{8,9} Each strip was rehydrated with 250 µg of soluble total protein diluted in 250 µL of rehydration buffer containing 2% (v/v) IPG buffer pH 4–7, 1.2% (v/v) DeStreak Reagent (both GE Healthcare), and 0.002% (w/v) bromophenol blue for 18 h. After rehydration, strips were submitted to IEF in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing

system (GE Healthcare) as follows: step one of 50 V until 25 Vh, step two of 500 V until 500 Vh, step three of 1000 V until 750 Vh, step four of 4000 V until 2500 Vh, step five of 8000 V until 15 000 Vh, and a final step of 6000 V until 6000 Vh, up to a total of 25 000 Vh, at a limit of 50 mA per strip. At the end of the first dimension, strips were kept at -80°C . Before the SDS-PAGE procedure, proteins in IPG strip were incubated in 5 mL of equilibration buffer (6 M urea, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 29.3% (v/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.002% (w/v) bromophenol blue with 1% (w/v) DTT) for 15 min followed by alkylation with 2.5% (w/v) iodoacetamide under the same conditions. The strips were then loaded on top of 12% SDS-PAGE, and Precision PlusProtein Standards (Bio-Rad, Hercules, CA) were applied. SDS-PAGE gels were performed in an SE 600 Ruby System (GE Healthcare) in pairs. The applied electric current was 15 mA per gel for 30 min and 30 mA per gel until the end of run. The temperature was kept at 10°C using a MultiTempIII thermostatic circulator (GE Healthcare). The gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) as described previously.²³

2.4 Image and Data Analysis.

Images of gels were acquired using Image Scanner System II and LabScan 5.0 software. Gels were analyzed using ImageMaster 2D Platinum 7.0 software (all from GE Healthcare), with the following parameters for spot detection: smooth ≥ 6 , area ≥ 11 , and saliency ≥ 100 . Triplicate gels of each cultivar were compared among themselves and after subsequently among the cultivars. For identification of differentially accumulated proteins, relative spot volume (% Vol) was compared among the cultivars with ANOVA by ImageMaster software. Spot volumes were considered with significant differences ($p < 0.05$) among mean value of each cultivar triplicates in comparison with other cultivars. For the principal component analysis (PCA), gels of four cultivars were compared together. The relative volumes of matched spots present in all gels were log₂ transformed, centered in relation to the median, normalized, and then submitted to PCA using the R language.²⁴

2.5 Mass Spectrometry.

Spots presenting differential accumulation were individually excised from gel and destained with a solution containing 40% (v/v) acetonitrile and 0.2 M ammonium bicarbonate, pH 8.5, for 30 min at 37 °C. After, the solution was replaced by pure acetonitrile and dried under vacuum. Gel pieces were kept on ice for 45 min with 20 ng/μL trypsin (Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega, Madison, WI) and then were incubated, in the dark, at 37 °C for 16 h in a solution containing 0.04 M ammonium bicarbonate, pH 8.5, and 9% (v/v) acetonitrile. Trypsin-digested peptides were extracted with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and 50% (v/v) acetonitrile.

Prior to MS analysis, MALDI matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) was prepared in 1 mL of 50% (v/v) acetonitrile with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid at final matrix concentration of 10 mg/mL. The samples and MALDI matrix solution were mixed in a 1:1 ratio, loaded on a MTP 384 target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), and dried at room temperature. The plate was inserted into the MALDITOF Autoflex III equipment (Bruker Daltonics) as described previously¹³ with some modifications. MS and MS/MS analyses were carried out with full automatic mode using FlexControl 3.3 software. MS data were acquired in a positive ion reflection mode with accelerating voltage of 20 kV, and MS/MS analyses were performed in a positive ion LIFT mode. For the LIFT, five random peaks were chosen using the Auto Execute method with following main parameters: laser firing rate of 100 Hz; mass range of 600–4000 Da; peak detection threshold for MS/MS of 1000 Da; laser intensity of 35–45%; and 4000 shots accumulated for each spectrum. The external calibration was performed using peptide mix $[M + H]^+$ ions with peptide calibration standard (Bruker Daltonics). Peak lists were created using FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics). Protein identification was performed using MASCOT software 2.4.00 (Matrix Science, Boston, MA) using *P. vulgaris* database, downloaded from UniProt Knowledgebase Web site. Search parameters used for protein identification: fixed modifications, carbamidomethylation of cysteine; variable modification, methionine oxidation; one trypsin missed cleavage; search error tolerance was set from 100–200 ppm; and a peptide charge 1 H⁺. Protein identification was considered with expectation value (E-value) < 0.05.

2.6 2-DE Standardization.

Approximately 40 g of 'BRS Esplendor' cultivar²⁵ grains was ground, and 2-DE was performed as described above. Protein extraction was performed in triplicate, IEF was performed in duplicate for each extract, and six IEF strips were focused together in first

dimension. For second dimension, six SDS-PAGE gels were run in pairs. Relative spot volumes (% Vol) were compared among all gels.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 2-DE Standardization.

First, 2-DE standardization was performed to measure experimental variations intrinsic to this approach. Three soluble protein extracts were obtained from a pool of grains of 'BRS Esplendor' common bean cultivar, and two gels were run for each extract. An average spot number of 406.33 ± 11.20 was detected, and 340 matched spots were present in all gels. By comparing matched spots of six gels in relation to gel presenting the highest number of spots (reference gel), the correlation coefficients (r) of scatter plots were in the range of 0.92–0.98, and the slopes varied from 1.07–1.27.

For comparative proteomics analysis of leaf and grain of common bean, TCA-based protein extraction and 2-DE with 13 cm IPG strips in the range pH 4–7 were successfully applied.^{13,22} 2-DE is widely used in the comparison of proteins between different groups and their replicates;²⁶ however, variation between the gels makes it difficult to match spots in image analysis.²⁷ This variation was compared in 2-DE standardization, and 84% of the spots were reproducible between the six gels of the same sample. Vidal et al.²⁸ considered in their study a value above 70% as high percentage of correspondence to ensure repeatability and reproducibility of 2-DE in analyzed samples.

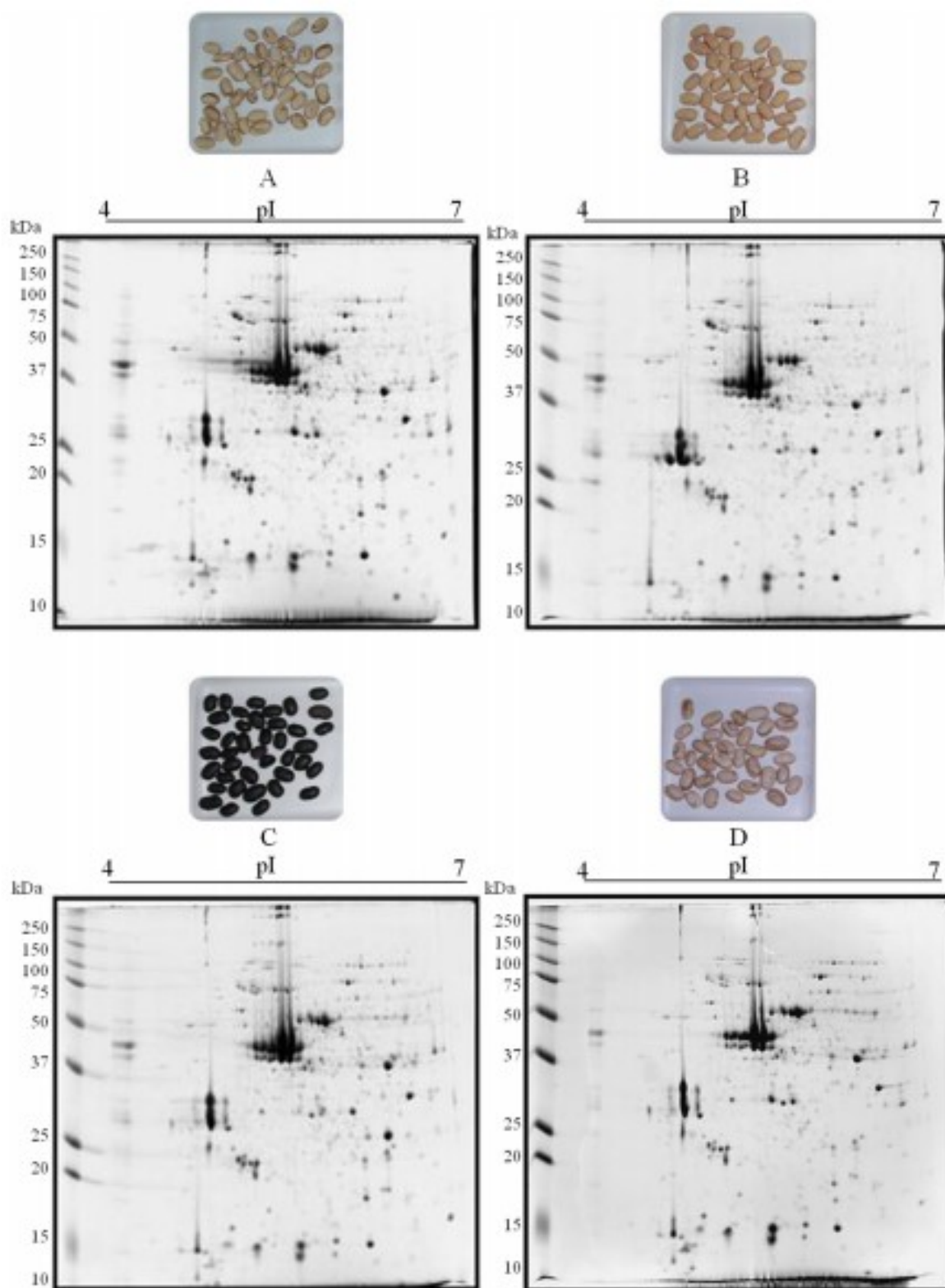


Figure 1. Reference maps of common bean grain proteome from (A) 'BRS Sublime', (B) 'BRS Vereda', (C) 'BRS Esteio', and (D) 'BRS Estilo' cultivars.

3.2 Comparison among Four Cultivars.

For grain proteome comparison among four cultivars, protein was extracted in triplicate for 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio', and 'BRS Estilo' cultivars, and one 2-DE gel was carried out for each protein extract (Figure 1). Data analysis was carried out as follows: first, three gels for each cultivar were analyzed using ImageMaster software to evaluate variability among replicates. The cultivar 'BRS Sublime' presented 93% matched spots among the gels of the same cultivar, while 'BRS Vereda' 90%, 'BRS Estilo' 89%, and 'BRS Esteio' 92%. High homogeneity among replicates was observed in this first matching setup (matching per cultivar) of four common bean cultivars, at least 89% of matched spots were observed in gels of the same cultivar. Therefore, this 2-DE analysis showed acceptable repeatability. Second, analysis among different cultivars was carried out, and C2 gel presented the highest number of spots among all gels, being used as reference. In this analysis, an average of 525 spots were detected, and 349 matched spots were present in all gels.

3.3 Principal Component Analysis.

PCA was applied to compare the differences in the percentage of volume (% Vol) of the matched spots in these cultivars, and all gels were compared together. PCA was performed using percentage volume of 349 matched spots as data set. The first 12 components explained 100% of data set variation, and two principal components (PC1 and PC2) accounted for 43.64% of total data variation, PC1 referred to 27.67% of total variation and PC2 referred to 15.97%. It was possible to observe clear separation among varieties (Figure 2). The results show a clear separation between 'BRS Estilo' and the other cultivars in PC1 and a clear separation between 'BRS Sublime' and 'BRS Esteio' in PC2, indicating a greater proximity in relation to spots accumulation between 'BRS Sublime' and 'BRS Vereda' cultivars. Our results confirm that PCA could be used for proteomic analysis of plant varieties as a basis for classification tools, it could be explored as a complementary approach for novel food analysis.²⁶ PCA was applied for grain and leaf proteome profiles comparison of two Embrapa 5.1 GM common bean varieties, Perola and Pontal, and their non-GM counterparts.^{13,22} PCA revealed that proteomes were more similar between GM common bean variety and its counterpart than between Perola and Pontal varieties.

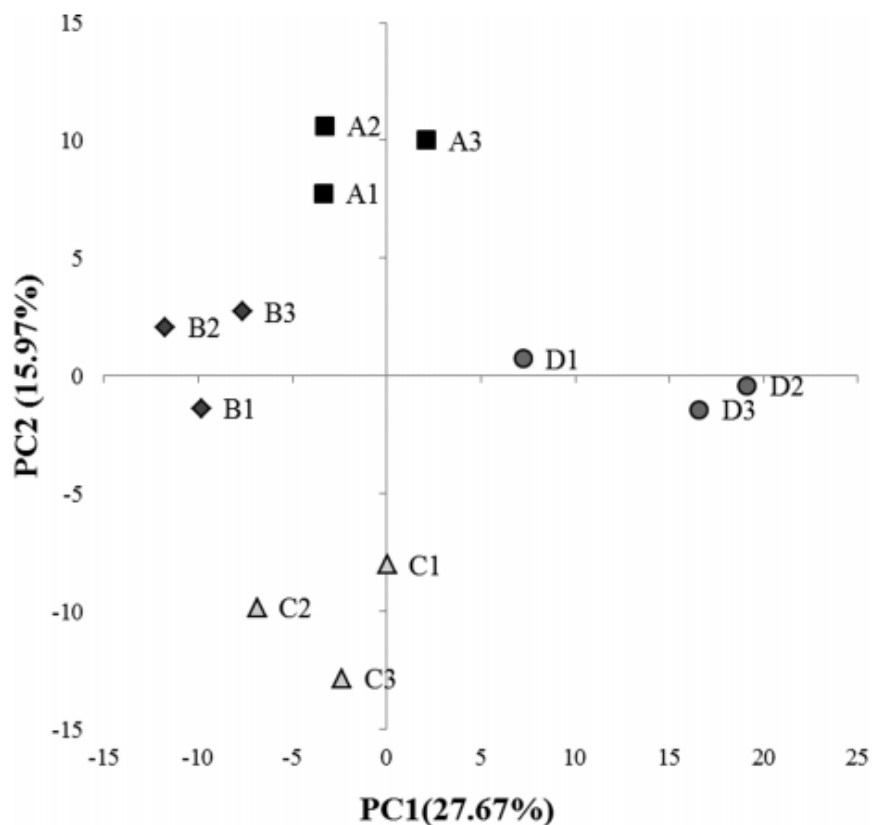


Figure 2. PCA plots of 349 matched spots volume (%Vol) of 2DE gels from grains of four common bean cultivars: (A) ‘BRS Sublime’, (B) ‘BRS Vereda’, (C) ‘BRS Esteio’, and (D) ‘BRS Estilo’. Numbers 1, 2, and 3 refer to the triplicate of each cultivar gels.

3.4 Differentially Accumulated Proteins.

Image analysis detected 257 differentially accumulated spots among gels of the four common bean cultivars (ANOVA, $p < 0.05$), among them 35 spots differentially accumulated presented % Volume >0.1 . Thirty spots differentially accumulated were present in all cultivars (Figure 3). The spot 223 presented high volume percentage (>1.2) and was excised for all cultivars to check identity. Five spots were present in only two cultivars. The average spot volumes (% Vol) of 35 differentially accumulated proteins are shown in Figure 4. They were excised from gels, digested with trypsin, and proteins were submitted to identification by MS and MS/MS analysis by querying the *P. vulgaris* database (from UniProtKB) using the MASCOT search engine.

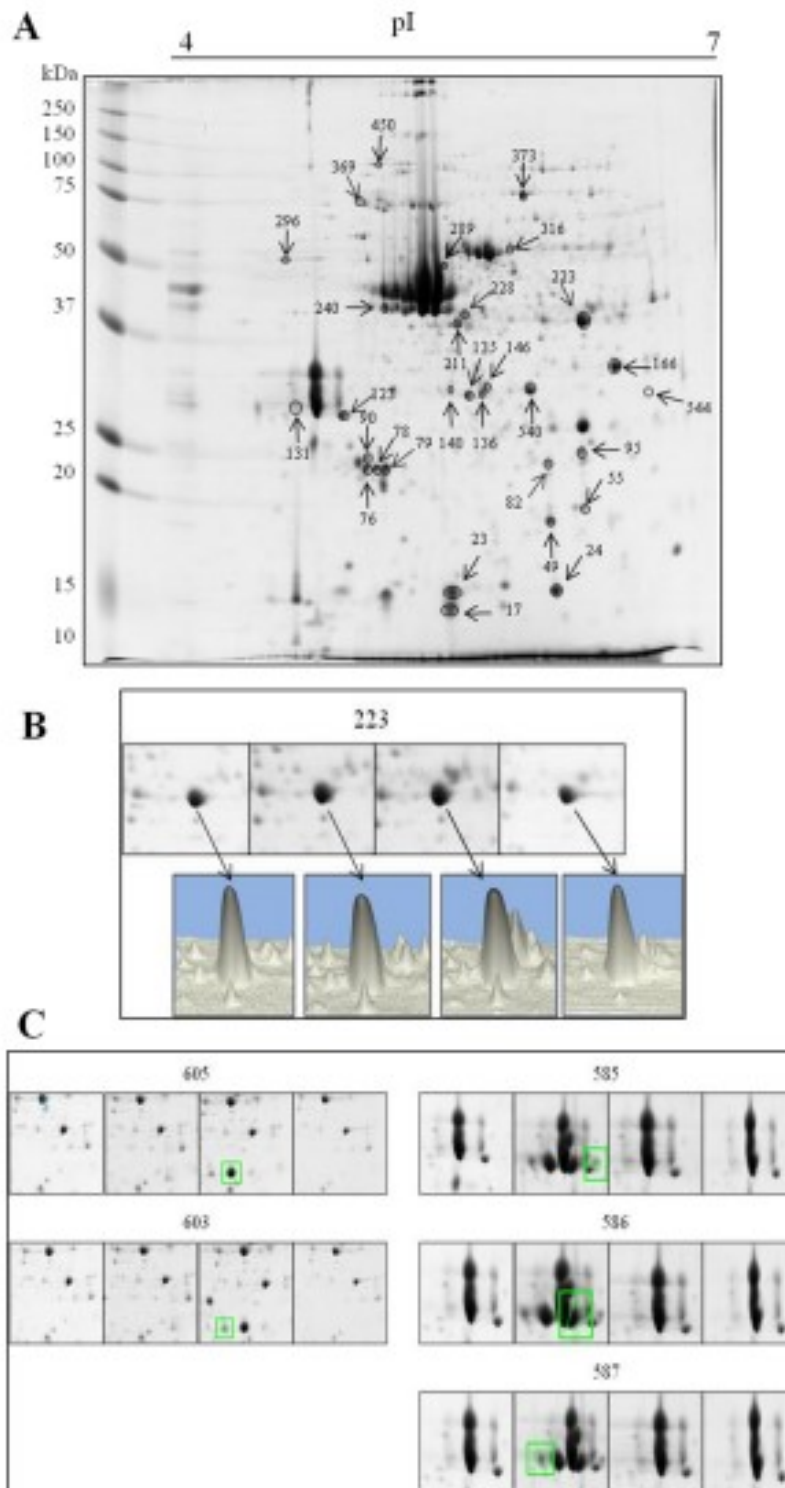


Figure 3. (A) Differentially accumulated proteins present in the four common bean cultivars identified by MS and MS/MS, marked by arrows (reference gel, C2). (B) Spots 223 excised from gels of ‘BRS Sublime’, ‘BRS Vereda’, ‘BRS Esteio’, and ‘BRS Estilo’ cultivars from left to right, respectively, in 2D and 3D images. (C) Exclusive spots of ‘BRS Vereda’ cultivar (585, 586, and 587) and ‘BRS Esteio’ cultivar (605 and 603), marked by squares and selected in ImageMaster in one of triplicate gels of each cultivar.

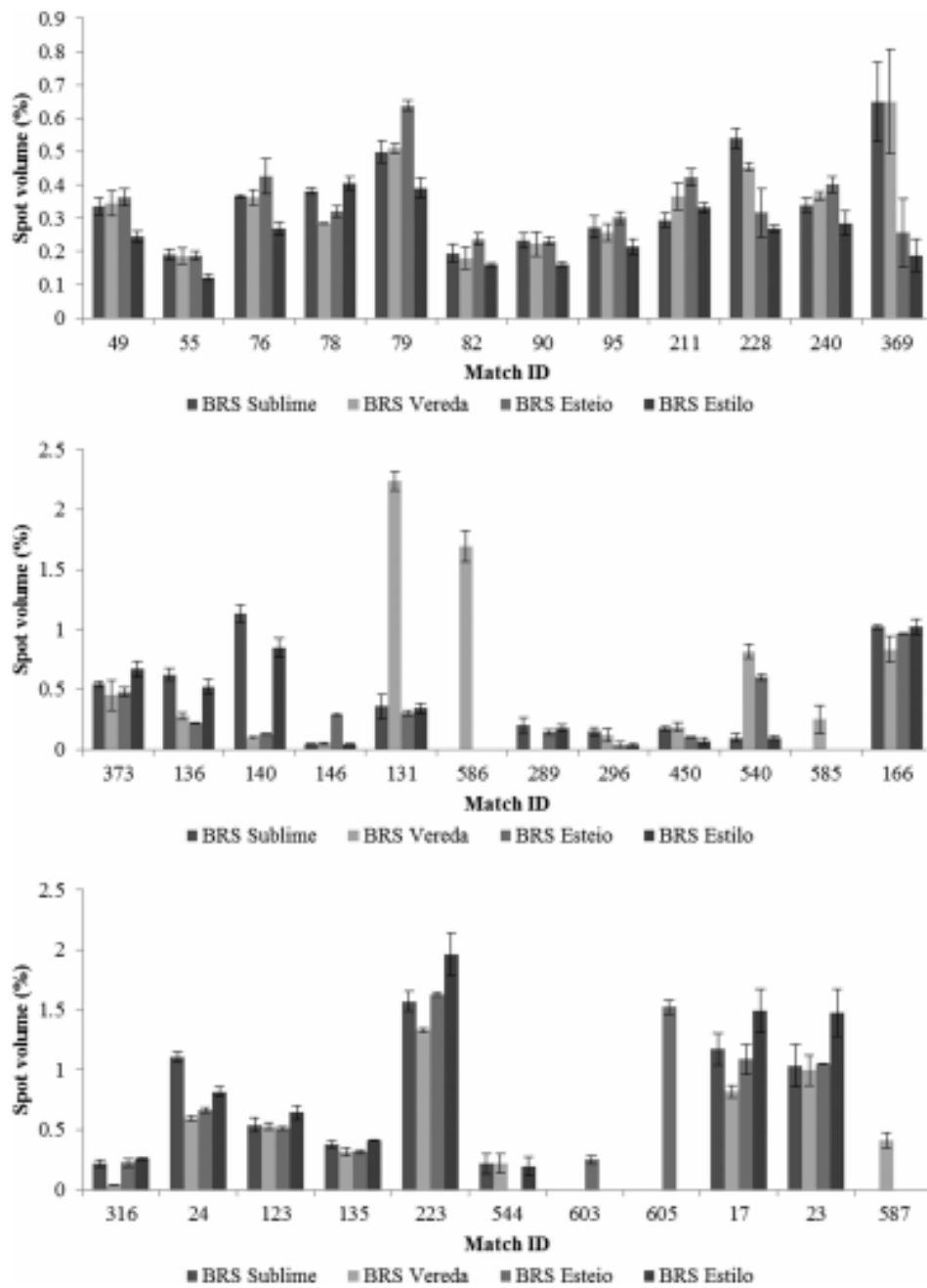


Figure 4. Average of spot volume percentage (% vol) of 35 differentially accumulated proteins from triplicate gels of 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio', and 'BRS Estilo' cultivars.

3.5 Protein Identification.

Among 35 differentially accumulated proteins, 32 were identified by MS or MS/MS (Table 1), and they were annotated according to UniProtKB database and classified on the basis of Gene Ontology (GO) molecular function categories: nutrient reservoir activity, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, carbohydrate binding, mannose binding, magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity, calcium ion binding, glycogen phosphorylase activity, pyridoxal phosphate binding, ATP binding, and proline-tRNA ligase activity. Molecular function was not assigned to nine proteins (unknown function). The spot 223 was excised from the gels of the four cultivars, and it was identified as the same uncharacterized protein (V7C8J3_PHAVU). Proteins annotated as uncharacterized proteins were subjected to BLAST search, and they presented high homology to proteins of *P. vulgaris* or other plants (Supporting Information). There are still few but very relevant proteomic studies about common bean cultivars. Recently, proteome changes during common bean seed development were unveiled; 418 differentially accumulated proteins were identified and 255 were characterized, most belonging to protein metabolism.¹² Highresolution 2-DE phaseolin profiles were used as molecular markers of genetic divergence and quality of seed protein in common bean populations.¹⁰ Protein profiles of improved common bean cultivars grown in Mexico and Brazil were evaluated,¹⁴ and 13 proteins were identified by MS. These authors observed similar protein profiles among common bean cultivars with high levels of defense-related proteins. In this work, 32 differentially accumulated common bean proteins were identified by MALDI-TOF/TOF (Table 1). Among them, eight proteins were identified as phaseolin (spots 49, 55, 76, 79, 90, 95, 82, and 240). These proteins were the major seed storage protein of common bean. Differences were observed between theoretical and experimental values in Mr or pI of seven proteins. In agreement with our results, phaseolins identified in common bean seed proteome presented Mr ranging from 17.7–51.1 kDa.⁸ These authors observed remarkable discrepancies between theoretical and experimental values of Mr or pI of most of phaseolins,⁸ and they considered that isoforms may be generated by post-translational modifications, alternative splicing, or multigene families. 2-DE phaseolin profiles of common bean seeds from 18 domesticated and wild accessions belonging to the Mesoamerican and Andean gene pools were evaluated and the authors¹⁰ identified the accessions belonging to each gene pool. Furthermore, some accessions, which were identified as outliers from proteomic distances, showed the highest levels of methionine content.

Table 1. Identification of Differentially Accumulated Proteins among Four Common Bean Cultivars, ‘BRS Sublime’, ‘BRS Vereda’, ‘BRS Esteio’, and ‘BRS Estilo’, by Peptide Mass Fingerprint (PMF) and MS/MS

match ID	accession ^a	protein description	M _r (kDa)/pI theoretical	M _r (kDa)/pI experimental	mascot score ^b	E-value	matched peptides	coverage ^c (%)	identification method
Nutrient Reservoir Activity									
49	Q43632_PHAVU	phaseolin	47.5/5.42	19/6.20	90	3.0 × 10 ⁻⁵	10	27	PMF-MS/MS (K.GNKETLEYESYR.A; K.EGALFVPHYYSKA; K.ETLEYESYR.A; K.DDVFPVIPAAYPVAIKA) ^d
55	XSD3J3_PHAVU	alpha-phaseolin	48.6/5.42	19/6.40	106	8.2 × 10 ⁻⁷	11	32	PMF-MS/MS (K.DDVFPVIPAAYPVAIKA; K.ETLEFESYR.A; K.EGALFVPHYYSKA; K.QSGSYFVDGHHHQEQK.G)
76	PHSB_PHAVU	phaseolin, beta-type	47.5/5.29	22/5.10	131	2.6 × 10 ⁻⁹	11	28	PMF-MS/MS (R.LQNLEDYRL; R.SGSAILVLVKPDDRR.E; R.EYFFLTSDNPIFSDHQK.I; K.IPAGTIFYLVNPDPK.E; K.HILEASFNSK.F)
78	V7BFL2_PHAVU	uncharacterized protein	41.3/4.98	22/5.16	86	8.4 × 10 ⁻⁵	10	27	PMF-MS/MS (R.SGSAILVLVKPDDRR.E; R.EYFFLTSDNPIFSDHQK.I; R.LQNLEDYRL; K.IPAGTIFYLVNPDPK.E)
79	Q43632_PHAVU	phaseolin	47.5/5.42	22/5.20	141	2.6 × 10 ⁻¹⁰	13	37	PMF-MS/MS (K.HILEASFNSK.F; R.SGSAILVLVKPDDRR.E; R.EYFFLTSDNPIFSDHQK.I; R.LQNLEDYRL; K.IPAGTIFYLVNPDPK.E)
82	Q43632_PHAVU	phaseolin	47.5/5.42	23/6.19	99	4.4 × 10 ⁻⁶	11	30	PMF-MS/MS (K.EGALFVPHYYSKA; K.DDVFPVIPAAYPVAIKA)
90	Q43632_PHAVU	phaseolin	47.5/5.42	23/5.11	123	1.6 × 10 ⁻⁸	11	32	PMF-MS/MS (R.LQNLEDYRL; R.SGSAILVLVKPDDRR.E; K.HILEASFNSK.F)
95	XSD3J1_PHAVU	alpha-phaseolin	48.5/5.53	25/6.38	122	2.1 × 10 ⁻⁸	11	33	PMF-MS/MS (K.ETLEFESYR.A; K.EGALFVPHYYSKA; K.DDVFPVIPAAYPVAIKA)
211	F8QXP7_PHAVU	legumin	69.1/5.64	38/5.63	81	0.00027	12	18	PMF-MS/MS (R.INSLNALKPDHR.V; R.EFYLAGNPDIHPEAIK.E)
228	V7BFL3_PHAVU	uncharacterized protein	57.5/5.68	41.0/5.75	108	5.2 × 10 ⁻⁷	12	31	PMF-MS/MS (K.LFLAMLHVPVSTPGK.F + Oxidation (M); R.LTIVEAKPHTFVAPR.H; K.FILESGDMLAIPAGTPLYVNR.D + Oxidation (M); K.GHLQIVCPHISSR.S)
240	PHSA_PHAVU	phaseolin, alpha-type	49.2/5.25	42/5.25	198	5.2 × 10 ⁻¹⁶	21	49	PMF-MS/MS (R.LQNLEDYRL; K.ETLEFESYR.A; K.EGALFVPHYYSKA; R.SGSAILVLVKPDDRR.E; K.IPAGTIFYLVNPDPK.E)
369	V7CF19_PHAVU	uncharacterized protein	85.2/5.00	73/5.07	142	2.1 × 10 ⁻¹⁰	20	25	PMF-MS/MS (K.ATELAVAVEGR.G; K.NNHHPFLAGK.G; K.GSILGPHWNPK.A)
373	F8QXP7_PHAVU	legumin	69.1/5.64	81/6.04	197	6.5 × 10 ⁻¹⁶	25	40	PMF-MS/MS (R.VVEEEEEYDEPVR.H)
Hydrolase Activity, Hydrolyzing O-Glycosyl Compounds									
136	V7AKA4_PHAVU	uncharacterized protein	36.9/5.87	28/5.77	76	0.00084	9	18	PMF-MS/MS (K.KASNYEGVMLWDRY + Oxidation (M); K.KASNYEGVMLWDR.Y)
140	V7AKA4_PHAVU	uncharacterized protein	36.9/5.87	28/5.58	76	0.00077	8	15	PMF-MS/MS (K.KASNYEGVMLWDRY + Oxidation (M); K.KASNYEGVMLWDR.Y)
146	V7AIB2_PHAVU	uncharacterized protein	35.6/5.40	31/5.84	75	1 × 10 ⁻⁶	-	7	MS/MS (R.VLLSIGGAPDYSSYSLSSPEDAK.E)
Carbohydrate Binding									
131	Q3LA43_PHAVU	phytohemagglutinin	29.4/4.65	28/4.74	43	0.002	-	5	MS/MS (K.GNVETNDVLSWSFASK.L)
586	Q8RVH2_PHAVU	phytohemagglutinin	29.3/5.22	28/4.88	75	0.001	9	41	PMF-MS/MS (K.GNVETNDVLSWSFASK.L; K.LSDGTTSEGLNLANLVLNK.I)

Table 1. continued

match ID	accession ^a	protein description	M _r (kDa)/pI theoretical	M _r (kDa)/pI experimental	mscqt score ^b	E-value	matched peptides	coverage ^c (%)	identification method
Mannose Binding									
585	PHAL_PHAVU	leucoagglutinating phytohemagglutinin	29.5/4.92	28/5.02	73	1.6 × 10 ⁻⁶	-	6	MS/MS (K.LSDGTTSEGLNLANLVLNK.I)
Magnesium Ion Binding, Phosphopyruvate Hydratase Activity									
289	V7CZL3_PHAVU	uncharacterized protein	49.9/5.40	48/5.48	96	8.6 × 10 ⁻⁶	11	30	PMF
Calcium Ion Binding									
296	V7BGH4_PHAVU	uncharacterized protein	48.4/4.50	51/4.55	111	2.6 × 10 ⁻⁷	11	35	PMF-MS/MS (R.FEDGWENR.W; K.QSGSLYSDWDLPPKK.I; K.SGTLFDNVLITDDIEYAK.Q)
Glycogen Phosphorylase Activity, Pyridoxal Phosphate Binding									
450	V7C329_PHAVU	alpha-1,4 glucan phosphorylase	111.6/5.25	103/5.20	179	4.1 × 10 ⁻¹⁴	28	28	PMF-MS/MS (K.QAYYLSMEFLQGRA + Oxidation (M); K.AASEEFDLYAFNAGR.H)
ATP Binding, Proline-tRNA Ligase Activity									
540	V7C248_PHAVU	uncharacterized protein	55.1/8.60	29/5.99	59	0.042	9	24	PMF
Unknown									
166	Q9FPW5_PHAVU	IAA-protein conjugate	35.5/6.20	33/6.58	92	2 × 10 ⁻⁵	15	48	PMF-MS/MS (R.DENFDLHSETNFR.Q; K.EAVVGKPHTVETSLGNDNSNRE)
316	Q2N1E0_PHAVU	group 3 late embryogenesis abundant protein	50.7/5.80	56/5.97	94	1.3 × 10 ⁻⁵	11	25	PMF-MS/MS (R.DREDVGVVDQLNNEEK.R; K.AGDYADYASQKA; K.GGEYKDYAAEK.A; K.VETTRPGALADTLKA; K.AADQNAGQTFNDVGR.F; R.FHDEEIVK.K)
24	V7BAC3_PHAVU	uncharacterized protein	17.8/6.00	16/6.24	118	5.2 × 10 ⁻⁸	12	52	PMF-MS/MS (M.SLIPNILGGR.R)
123	V7BBR4_PHAVU	uncharacterized protein	26.2/5.05	28/4.96	109	4.1 × 10 ⁻⁷	9	58	PMF-MS/MS (R.GSAITIGEALATAQTVGYK.V; K.AVTLQDAEGVASAEVR.N; R.RPQPGQDPIK.Y; R.NNPDATATPGGIAASVAAAAA.R)
135	V7BSG9_PHAVU	uncharacterized protein	27.9/5.68	28/5.69	108	5.2 × 10 ⁻⁷	12	60	PMF-MS/MS (R.LHQNFLQCAVYDSDESDAR.L; K.LWHSWAYEIK.S; K.YIISSESLK.S)
223A ^e	V7C8J3_PHAVU	uncharacterized protein	39.2/6.57	37/6.31	86	8 × 10 ⁻⁵	13	31	PMF-MS/MS (R.SKEGSEYANDAAQR.T)
223B ^e	V7C8J3_PHAVU	uncharacterized protein	39.2/6.57	38/6.35	90	3.7 × 10 ⁻⁵	14	31	PMF-MS/MS (R.SKEGSEYANDAAQR.T)
223C ^e	V7C8J3_PHAVU	uncharacterized protein	39.2/6.57	38/6.35	70	0.0037	13	34	PMF-MS/MS (R.SKEGSEYANDAAQR.T)
223D ^e	V7C8J3_PHAVU	uncharacterized protein	39.2/6.57	38/6.35	94	1.3 × 10 ⁻⁵	13	35	PMF-MS/MS (R.SKEGSEYANDAAQR.T)
544	V7C790_PHAVU	uncharacterized protein	26.4/6.34	29/6.74	69	0.004	6	28	PMF-MS/MS (K.QYEDEQGR.K; R.QHGTTGGFTGDTGR.Q; R.QHGTTGGLTGDTR.Q)
603	V7C790_PHAVU	uncharacterized protein	26.4/6.34	27/6.22	73	0.0016	6	28	PMF-MS/MS (R.SGTGGGYSGTGAGYGRE; K.QYEDEQGR.K)
605	V7C790_PHAVU	uncharacterized protein	26.4/6.34	27/6.39	59	0.04	5	28	PMF-MS/MS (R.SGTGGGYSGTGAGYGRE; K.QYEDEQGR.K)

^aAccess in the UniprotKB database. ^bMascot score represents the score obtained in the matching with *P. vulgaris* database from UniprotKB by MASCOT software. ^cCoverage: percentage of the protein sequence that corresponds to matched peptides. ^dPeptide Sequence (MS/MS). ^eSame spot (223) on the different cultivars (A, 'BRS Sublime'; B, 'BRS Vereda'; C, 'BRS Esteio'; D, 'BRS Estilo'). The identified proteins are divided according to the molecular function.

Authors suggested that 2-DE phaseolin profiles provide valuable information with potential for being used in common bean genetic improvement.¹⁰

In our study, two spots were identified as legumin (spots 211 and 373). Legumin is a member of the high molecular weight 11S globulins, comprising about 3% seed protein in common bean cultivars, compared to other grain legumes.²⁹ They have higher levels of sulfur amino acids than 7S globulins,³⁰ and they consist of the acidic alpha subunit with predicted Mr of 46.4 kDa and pI of 5.45 and the basic beta subunit with a Mr of 19.8 kDa and pI of 7.03.²⁹

Three spots (78, 228, and 369) were annotated as uncharacterized proteins and classified by GO as nutrient reservoir activity. They presented Cupin_1 domains. The characteristic cupin domain comprises two conserved motifs of beta-strands, separated by a less conserved region of another two beta-strands with an intervening loop of variable length.³¹ Cupin domain is a conserved motif in several proteins including seed storage globulins.³¹ The spot 78 presented homology to phaseolins, the spot 228 to sucrose-binding protein-like, and the spot 369 to vicilin-like antimicrobial peptides²⁻².

Spots 136, 140, and 146 were annotated as uncharacterized proteins assigned to molecular function hydrolase activity/ hydrolyzing O-glycosyl compounds. Spots 136 and 140 were identified as the same protein, both presented high volume percentages in ‘BRS Sublime’ and ‘BRS Estilo’ cultivars. These spots presented homology with acidic endochitinase-like isoform X1 (*Cajanus cajan*), while spot 146 presented homology with acidic endochitinase-like isoform X2 (*Cajanus cajan*). Spot 146 presented high volume percentage in ‘BRS Esteio’ cultivar.

Spots 131 and 586 were identified as a phytohemagglutinins (PHA), while spot 585 was identified as a leucoagglutinating phytohemagglutinin (PHA-L). PHA-L is the leucocyteagglutinating form of PHA, a tetrameric glycoprotein that was stored in the vacuoles of parenchyma cells.³² The spot 131 presented high accumulation in ‘BRS Vereda’ cultivar, and spots 585 and 586 were observed only in this cultivar. These spots were identified as lectins that are known to cause reduction of protein digestibility and be toxic at the intestine; however, they could also exert beneficial effects at certain concentrations.^{33, 34} Storage proteins such as phaseolins, legumins, phytohemagglutinins, and lectins are important for the human dietary protein intake and constitute a source of energy for the germinating seed. The accumulation of these proteins could be controlled to improve the nutritional value of common bean.¹² ‘BRS Vereda’ cultivar presented high accumulation of phytohemagglutinins.

The spot 289 was identified as uncharacterized protein and assigned to magnesium ion binding function. It presented low accumulation in ‘BRS Vereda’ and presented high homology

with enolases. The spot 296 was an uncharacterized protein assigned to calcium ion binding function and presented homology to calreticulin.

The spot 450 was identified as α -1.4 glucan phosphorylase. Glucan phosphorylases metabolizes starch.³⁵ In higher plants, plastidial and cytosolic starch phosphorylases isoforms are present, and both share considerable sequence homology.³⁶ In legume cotyledons, cytosolic phosphorylases can degrade starch as amyloplast membranes lose their integrity.³⁵

The spot 540, uncharacterized protein assigned to ATP binding function/proline-tRNA ligase activity, was high accumulated in ‘BRS Vereda’ and ‘BRS Esteio’ cultivars. This protein presented high homology to hypothetical protein (*P. vulgaris*) and proline-tRNA ligase (*Vigna radiata* and *V. angularis*). The spot 166 was identified as IAA–protein conjugate (IAP1), which contained indole acetic acid (IAA) attached directly to the protein, as a prosthetic group.³⁷ IAP1 levels were four-fold elevated in common bean mutant line, SMARC1N-PN1, which lacked major seed storage proteins, compared to wild-type SARC1 line.¹¹

The spot 316 was less accumulated in ‘BRS Vereda’ cultivar than in other cultivars, and it was identified as group 3 late embryogenesis abundant protein (LEA3 group). Group 3 LEA proteins were involved in preventing protein aggregation,³⁸ and LEA3 transcript level was highly upregulated in common bean roots.³⁹ The accumulation of LEA proteins to high levels was observed during last stage of seed maturation.⁴⁰ They were recently identified in pigeonpea seed proteome reference map.⁴¹

Seven proteins were annotated as uncharacterized proteins with unknown function. The spot 24 was more accumulated in ‘BRS Sublime’ cultivar than in other cultivars. Spots 123, 135, and 223 were more accumulated in ‘BRS Estilo’ cultivar compared to others. The spot 544 was not observed in ‘BRS Esteio’ cultivar. Spots 603 and 605 were observed only in ‘BRS Esteio’ cultivar. The spot 24 presented homology to heat shock protein (*Cajanus cajan*). The spot 123 presented homology to late embryogenesis abundant protein (*V. radiata* and *V. angularis*) and hypothetical protein (*V. angularis*). The spot 135 presented homology to oil body-associated protein 2B-like (*V. angularis*). The spot 223 had the highest percentage of volume among these spots and presented homology to late embryogenesis abundant protein D-29 isoform X2 (*V. angularis*). Spots 544, 603, and 605 were identified as the same protein and presented homology to putative dehydrin (*Helianthus petiolaris*).

In our study, 32 differentially accumulated proteins of Brazilian common bean cultivars were identified. The storage proteins, such as phaseolins, legumins and lectins, represented the majority of identified proteins, and novel proteins were also identified. Statistical analysis using PCA demonstrated clear separation in protein profiles of common bean cultivars. ‘BRS Esteio’ cultivar was separated from the others in PCA plot, while BRS Sublime and ‘BRS Vereda’ cultivars grouped closer. Three cultivars analyzed in this study are part of the most cultivated and consumed commercial groups in Brazil, “carioca” (‘BRS Sublime’ and ‘BRS Estilo’) and black (‘BRS Esteio’). The pink group cultivar (‘BRS Vereda’) constitutes a new grain alternative for consumers. As Brazil is one of the largest producers and consumers of beans in the world, studies such as ours provide important information for breeding programs about protein accumulation among different common bean cultivars.

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03220.

Experimental design of total soluble protein extraction and 2-DE; experimental design for 2-DE standardization; total soluble protein content of common bean cultivars; matching data from common bean protein for 2-DE standardization; 2-DE comparison among gel triplicates of each common bean cultivar; matching data from common bean protein spots detected in 2-DE gels of four common bean cultivars; mean volume percentage of differentially accumulated spots obtained from triplicate gels of each cultivar; homologous protein blasted against the NCBI database for the uncharacterized proteins from common bean database (PDF)

Funding

The work was financially supported by CNPq. G.B.R. and P.A.V.-N. were recipients of PhD and postdoc fellowships from Coordination of Personnel Improvement of Higher Education (CAPES), Ministry of Education, Brazil, and A.C.M.A. was a recipient of research fellowship (PQ2) from CNPq.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank CEBIME UFSC for MS facilities and Dr. Miguel Pedro Guerra from LFDGV UFSC for Image Scanner. We would like to thank Milene Marquezi, Geisi Mello Balsamo, Carla Souza Mello, and Maryella Osorio Vargas for technical support.

ABBREVIATIONS USED

CHAPS, (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate); DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; IAA, indole acetic acid; GM, genetically modified; IEF, isoelectric focusing; IPG, immobilized pH gradient; LEA, late embryogenesis abundant; MALDI, matrixassisted laser desorption ionization; MS, mass spectrometry; PCA, principal component analysis; PHA, phytohemagglutinin; PHA-L, leucoagglutinating phytohemagglutinin; PMSF, phenylmethane sulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TCA, trichloroacetic acid; TOF, time-of-flight; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis

SUPPORTING INFORMATION

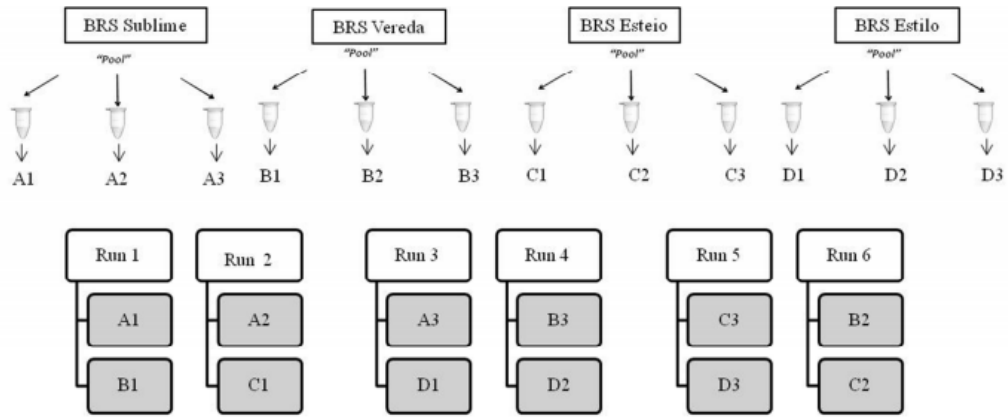


Figure S1. Experimental design of total soluble protein extraction and 2-DE of common bean cultivars, 'BRS Sublime' (A), 'BRS Vereda' (B), 'BRS Esteio' (C) and 'BRS Estilo' (D).

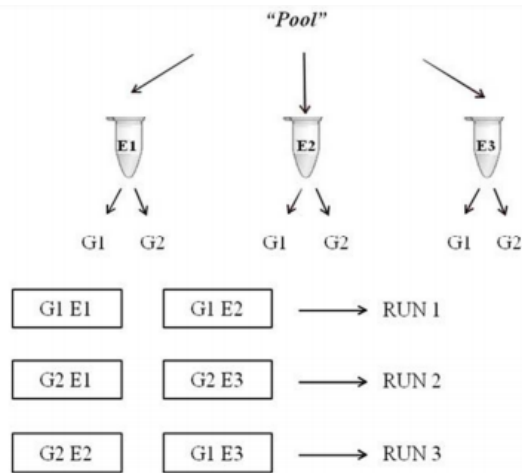


Figure S2. Experimental design for 2-DE standardization with 'BRS Esplendor' common bean cultivar. Letter G refers to gel and letter E refers to extract.

Table S1. Total soluble protein content of common bean cultivars 'BRS Esplendor', 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio' and 'BRS Estilo'.

Sample	Extract 1 (mg/g)	Extract 2 (mg/g)	Extract 3 (mg/g)	Average ± SD (mg/g)
'BRS Esplendor' (standardization)	17.80	20.73	18.03	18.85 ± 1.63
'BRS Sublime' (A)	9.15	9.39	10.13	9.56 ± 0.51
'BRS Vereda' (B)	10.68	10.25	12.07	11.00 ± 0.95
'BRS Esteio' (C)	11.79	9.19	10.48	10.49 ± 1.30
'BRS Estilo' (D)	10.17	9.49	10.21	9.96 ± 0.40

Table S2. Matching data from common bean protein for 2-DE standardization.

'BRS Esplendor'		Number of spots	Matched spots related to all gels (%)	Matched spots related to reference gel (%)	<i>Slope</i>	<i>r</i>
E1	G1	411	401 (98)	381 (93)	1.11	0.97
	G2*	418	409 (98)	-	-	-
E2	G1	418	407 (97)	389 (93)	1.16	0.98
	G2	397	395 (99)	387 (97)	1.27	0.92
E3	G1	403	397 (99)	389 (96)	1.07	0.98
	G2	391	389 (99)	382 (98)	1.17	0.98

*G2, reference gel. Letter G refers to gel and letter E refers to extract.

Table S3. 2-DE comparison among gel triplicates of each common bean cultivar 'BRS Sublime' (A), 'BRS Vereda' (B), 'BRS Esteio' (C) and 'BRS Estilo' (D). Matched spots, slope and correlation coefficients (r) obtained from scatter plots.

Gels	Number of spots	Matched spots	Slope	r
A1*	558	-	-	-
A2	532	528	0.81	0.98
A3	511	510	0.79	0.98
B1	556	546	1.09	0.99
B2*	560	-	-	-
B3	503	492	0.78	0.98
C1	517	509	0.96	0.99
C2*	569	-	-	-
C3	563	554	1.04	1.00
D1*	497	-	-	-
D2	436	433	0.87	0.99
D3	494	480	0.98	0.98

*Reference gel of each cultivar.

Table S4. Matching data from common bean protein spots detected in 2DE gels of four common bean cultivars 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio' and 'BRS Estilo'.

Cultivar	Gel	Number of spots	Number of spots (Average \pm SD)	CV (%)	Matched spots related to all gels (%)	Matched spots related to reference gel (%)	Slope	<i>r</i>
'BRS Sublime'	A1	558			545 (98%)	518 (93%)	1.05	0.98
	A2	532	534 \pm 23.5	4.4	525 (99%)	501 (94%)	0.85	0.98
	A3	511			508 (99%)	482 (94%)	0.83	0.98
'BRS Vereda'	B1	556			532 (96%)	506 (91%)	1.02	0.96
	B2	560	540 \pm 31.8	5.9	537 (96%)	514 (92%)	0.93	0.96
	B3	503			483 (96%)	467 (93%)	0.72	0.97
'BRS Esteio'	C1	517			502 (97%)	509 (98%)	0.96	0.99
	C2*	569	550 \pm 28.4	5.2	548 (96%)	-	-	-
	C3	563			543 (96%)	554 (98%)	1.04	1.00
'BRS Estilo'	D1	497			494 (99%)	482 (97%)	0.94	0.98
	D2	436	476 \pm 34.4	7.2	435 (100%)	424 (97%)	0.82	0.98
	D3	494			489 (99%)	478 (97%)	0.92	0.98

*C2, reference gel. SD- standard deviation, CV-Coefficient of variation (%), *r*- correlation coefficient

Table S5. Mean volume percentage (%Vol) of differentially accumulated spots obtained from triplicate gels of each cultivar and presenting significant difference (ANOVA, $p < 0.05$).

Match ID	Max Vol	Match Count	'BRS Esteio' (C) (%Vol)	'BRS Vereda' (B) (%Vol)	'BRS Sublime' (A) (%Vol)	'BRS Estilo' (D) (%Vol)	<i>p</i> value
1	0.288883	3	0.272698		0.288883	0.222396	1.14E-04
2	0.0667693	3	0.0523419		0.0666024	0.0667693	1.06E-04
6	0.484591	4	0.359017	0.30963	0.484591	0.10455	0.00370406
12	0.97135	4	0.467691	0.282002	0.647319	0.97135	6.72E-04
14	0.268898	4	0.162732	0.0797883	0.140874	0.268898	0.0303534
17	1.49079	4	1.08732	0.819918	1.17076	1.49079	0.00173652
18	0.204199	4	0.157176	0.144645	0.157694	0.204199	0.00874141
19	0.186382	4	0.186382	0.0770941	0.163268	0.177866	0.00484461
21	1.17046	4	1.17046	0.689064	1.12008	1.13209	0.00177767
23	1.475	4	1.05136	0.994982	1.03567	1.475	0.0119209
24	1.10533	4	0.663318	0.59845	1.10533	0.817679	3.50E-07
31	0.0926255	4	0.0674283	0.0614218	0.0661017	0.0926255	0.0316404
35	0.0974404	4	0.0520344	0.0408149	0.0571003	0.0974404	0.0037622
44	0.0701135	4	0.0457792	0.0377899	0.0137393	0.0701135	0.0173884
45	0.0480597	4	0.0408357	0.0325527	0.0376134	0.0480597	0.0315466
49	0.3629	4	0.3629	0.34511	0.336632	0.245188	0.00349424
51	0.0892439	4	0.0619688	0.0506197	0.0659039	0.0892439	0.0239929
52	0.176886	4	0.146568	0.115803	0.164307	0.176886	9.89E-04
54	0.129724	4	0.0794595	0.129724	0.0675768	0.102969	0.0111707
55	0.190736	4	0.188589	0.185773	0.190736	0.122287	0.00248625
58	0.0686454	4	0.0398035	0.0371959	0.046712	0.0686454	0.016289
59	0.0982519	4	0.0853425	0.0683073	0.068086	0.0982519	0.0346784

65	0.849767	4	0.555467	0.549866	0.610331	0.849767	0.00466737
67	0.0573002	4	0.0487152	0.0400419	0.0573002	0.0572238	0.0142431
76	0.426318	4	0.426318	0.363786	0.365282	0.267901	0.0015145
78	0.403557	4	0.320042	0.284719	0.381619	0.403557	1.98E-05
79	0.638049	4	0.638049	0.50979	0.499791	0.391076	1.61E-05
80	0.117995	4	0.0345926	0.117995	0.0678247	0.0605592	4.25E-06
82	0.236673	4	0.236673	0.179329	0.19447	0.15996	0.0224716
85	0.19905	4	0.191702	0.18048	0.19905	0.149971	0.0192711
86	0.448581	4	0.448581	0.34044	0.443448	0.335582	0.00393751
90	0.232181	4	0.229877	0.222389	0.232181	0.161055	0.0129879
93	0.0809867	4	0.0809867	0.0759525	0.0659405	0.0582657	0.00274396
94	0.054441	4	0.039023	0.0269087	0.0453743	0.054441	0.0134275
95	0.301107	4	0.301107	0.256373	0.273168	0.214231	0.0180339
96	0.0655195	4	0.0603069	0.055434	0.0476716	0.0655195	0.0374967
99	0.173593	4	0.120168	0.173593	0.0668066	0.0757969	0.012866
100	0.179097	4	0.0928386	0.0254121	0.124564	0.179097	0.00137902
103	0.0511838	4	0.0436694	0.0356459	0.0446706	0.0511838	0.00414411
105	0.0524919	3	0.0136453		0.032422	0.0524919	0.0013399
106	0.10098	4	0.0852911	0.060644	0.10098	0.0993644	8.87E-04
108	0.0734004	4	0.0498421	0.0730307	0.0645991	0.0734004	0.0271359
110	0.191979	4	0.0742945	0.191979	0.0523796	0.0409774	2.42E-04
117	0.0590009	4	0.0290138	0.0222545	0.0569289	0.0590009	0.0222676
118	0.181458	4	0.181458	0.0722145	0.0624053	0.079932	0.0176643
123	0.643697	4	0.515242	0.52994	0.541337	0.643697	0.0285075
124	0.0646517	4	0.0379396	0.0303401	0.0448108	0.0646517	0.0190655
127	0.0892236	4	0.0698856	0.0543769	0.0856247	0.0892236	0.00969602
128	0.378669	4	0.114694	0.378669	0.148085	0.146774	0.039299

130	0.315599	3	0.234851		0.253034	0.315599	7.65E-06
131	2.23828	4	0.302061	2.23828	0.357289	0.340813	1.07E-09
135	0.410111	4	0.315846	0.316363	0.378339	0.410111	0.00316946
136	0.624779	4	0.217695	0.276227	0.624779	0.522748	6.25E-06
137	0.0846102	4	0.0669869	0.0568203	0.0617098	0.0846102	0.0259723
139	0.0858131	4	0.0858131	0.0802744	0.0516216	0.07143	0.0327635
140	1.13077	4	0.12674	0.0971196	1.13077	0.847673	1.67E-08
141	0.147496	4	0.104976	0.0629927	0.147496	0.123503	5.07E-04
142	0.26589	4	0.195528	0.180307	0.232268	0.26589	0.0053255
143	0.0503968	4	0.0317726	0.0487099	0.0482691	0.0503968	0.0131382
145	5.8451	4	4.57171	5.8451	5.17927	5.098	0.0336041
146	0.288293	4	0.288293	0.0478872	0.0405925	0.04052	4.26E-06
147	0.188515	4	0.100852	0.102518	0.144199	0.188515	0.0500472
149	0.0653468	4	0.0472462	0.0198784	0.0410974	0.0653468	0.0179146
151	0.0851366	4	0.0696456	0.0360289	0.0532723	0.0851366	0.0163464
158	0.477704	4	0.388833	0.299563	0.319957	0.477704	0.0145856
165	2.76796	4	2.32019	2.15155	2.31344	2.76796	0.00202723
166	1.02497	4	0.968054	0.834389	1.01962	1.02497	0.0184634
169	0.092953	4	0.0676164	0.0665342	0.0812857	0.092953	0.0493327
173	0.052423	4	0.044167	0.0392124	0.052423	0.0509831	0.0101726
181	0.0542422	4	0.0542422	0.0185241	0.0417058	0.0451569	0.0138043
184	0.0810701	3	0.0568591		0.0643206	0.0810701	0.00789002
196	0.0536415	4	0.0371591	0.0487156	0.0212077	0.0536415	0.00807132
201	0.0817069	4	0.0226391	0.0310909	0.0817069	0.0787133	3.69E-04
202	0.0713033	4	0.0567042	0.0539492	0.0681729	0.0713033	0.00903269
204	0.0809776	4	0.0251397	0.0698388	0.0809776	0.0711226	0.00435239
210	0.333375	4	0.321946	0.333375	0.279524	0.194991	4.12E-04

211	0.422079	4	0.422079	0.365192	0.294445	0.33086	0.00248771
214	0.0869551	4	0.0781902	0.0579728	0.0869551	0.0825531	0.00593407
217	0.351577	4	0.313652	0.239638	0.29318	0.351577	0.0146228
220	0.147249	4	0.132555	0.0889295	0.0324604	0.147249	0.00757096
222	0.114345	4	0.0854614	0.0896797	0.0959899	0.114345	8.05E-04
223	1.96138	4	1.63078	1.33015	1.57131	1.96138	4.64E-04
225	0.0360997	4	0.0267399	0.0182019	0.0269334	0.0360997	0.0126579
226	0.157902	4	0.0288436	0.0238353	0.0248808	0.157902	1.21E-06
228	0.539503	4	0.316736	0.454165	0.539503	0.268425	1.28E-04
230	0.634418	4	0.634418	0.546062	0.499554	0.481695	0.00425151
231	0.278174	4	0.278174	0.255432	0.237909	0.20804	0.00335934
232	0.177176	4	0.177176	0.147896	0.138651	0.139352	0.0055678
234	0.06526	4	0.06526	0.0432304	0.0443461	0.0517422	0.00114967
237	0.0621112	4	0.0621112	0.0266952	0.0280779	0.0414353	0.0215911
239	0.424712	4	0.424712	0.361911	0.349323	0.28749	0.00721091
240	0.400299	4	0.400299	0.368172	0.339721	0.285194	0.0028402
243	0.104778	4	0.0580704	0.0685713	0.0519251	0.104778	0.00766407
245	0.440318	4	0.440318	0.12249	0.078377	0.316189	2.72E-04
249	0.101237	4	0.101237	0.0696064	0.0697301	0.075898	0.00302129
264	1.24272	4	1.24272	1.00928	0.939833	0.9795	0.00796549
272	0.0537451	4	0.0410832	0.040742	0.0537451	0.0456591	0.0491381
275	0.0594141	4	0.00886973	0.0140394	0.0125655	0.0594141	0.0149933
284	0.102471	4	0.102471	0.0925423	0.0961863	0.0597169	0.00282586
289	0.204458	3	0.141392		0.204458	0.180359	3.91E-04
293	0.150029	4	0.105076	0.109861	0.150029	0.0839051	8.12E-05
295	0.0583721	4	0.0355926	0.0480157	0.0583721	0.0419571	0.00972827
296	0.148026	4	0.033226	0.116507	0.148026	0.032938	0.00824158

298	0.0324921	3	0.0324921	0.0146927		0.0198609	0.0447355
302	0.0863412	4	0.0863412	0.0429028	0.0527286	0.0805479	0.050354
305	0.0377964	2	0.0232971			0.0377964	0.0385555
306	0.540855	4	0.364416	0.322777	0.461847	0.540855	0.00537477
307	0.0964791	4	0.0964791	0.0714343	0.040653	0.0233209	0.0340703
309	0.97352	4	0.71437	0.97352	0.730294	0.79334	0.00480169
310	0.150869	3	0.0556895	0.029388		0.150869	8.39E-06
311	0.137284	2	0.0643197			0.137284	6.90E-05
313	0.115835	4	0.0769219	0.0366717	0.0182499	0.115835	0.00168708
314	0.265612	4	0.151187	0.0476524	0.0493171	0.265612	1.74E-04
315	0.206971	4	0.158378	0.0614238	0.0411806	0.206971	0.0015427
316	0.258894	4	0.225824	0.0348223	0.215376	0.258894	7.41E-06
317	0.0619449	4	0.0619449	0.0537641	0.0393494	0.043502	0.0263234
318	0.250872	4	0.231553	0.0741952	0.0573935	0.250872	0.00321288
320	0.175845	4	0.163109	0.0729924	0.0712463	0.175845	2.60E-04
321	0.0879596	2	0.0800956			0.0879596	2.27E-05
322	1.40796	4	0.808758	1.40796	0.861401	0.979077	6.27E-07
334	0.0509504	4	0.0317415	0.0365757	0.0293051	0.0509504	0.0058795
340	0.182045	4	0.165416	0.182045	0.149488	0.112887	0.0406006
342	0.0557429	4	0.0445892	0.0346763	0.0268704	0.0557429	0.0138289
343	0.105232	4	0.0703883	0.0780247	0.105232	0.0808386	0.0176241
344	0.109108	4	0.0387586	0.0527365	0.0875245	0.109108	0.00118858
346	0.105573	4	0.0649683	0.0690125	0.105573	0.0735606	0.0120264
347	0.320939	4	0.166365	0.196207	0.320939	0.251408	0.00207892
350	0.0844383	3	0.0561903		0.0326053	0.0844383	0.00285628
353	0.213384	4	0.213384	0.200337	0.196821	0.146306	0.0411313
354	0.113944	3	0.0492253		0.0268879	0.113944	0.00603323

357	0.0288733	3	0.0288733		0.00462541	0.0189776	0.0500976
359	0.388893	4	0.388893	0.232119	0.295497	0.291658	0.0415664
360	0.156484	3	0.148518		0.156484	0.139774	3.83E-05
363	0.358422	4	0.358422	0.311708	0.301468	0.265362	0.0470229
365	0.0989931	4	0.0913498	0.0989931	0.0743271	0.0542637	0.0181293
366	0.399819	4	0.240461	0.387802	0.399819	0.113204	0.00642543
368	0.178718	4	0.178718	0.135882	0.061511	0.13994	0.0184845
369	0.649354	4	0.255409	0.649354	0.648885	0.188496	0.00139308
373	0.670917	4	0.478228	0.451226	0.54304	0.670917	0.028176
379	0.0664357	2	0.0371736			0.0664357	0.0127473
380	0.0298376	3	0.0298376	0.0266093	0.025155		3.88E-05
384	0.0753596	4	0.0326431	0.0605836	0.0753596	0.0202927	0.0188789
385	0.0712045	4	0.0712045	0.0511384	0.0515761	0.0493491	0.0206132
386	0.0820942	4	0.0820942	0.0686027	0.0789383	0.0487556	0.023861
399	0.0294485	2	0.0265062			0.0294485	0.0258326
400	0.073379	4	0.073379	0.0325234	0.0241534	0.0643686	0.0140464
401	0.0714029	3	0.0714029	0.0272427		0.0532928	0.00263161
407	0.0653231	4	0.0653231	0.0522548	0.0548492	0.0361696	0.0243503
413	0.216303	4	0.193067	0.216303	0.19986	0.121358	0.0340782
414	0.589766	4	0.240927	0.589766	0.282812	0.497096	0.00476854
417	0.360007	4	0.322695	0.345249	0.360007	0.0659247	0.00345469
418	0.159407	3	0.159407	0.158992	0.102213		0.0144757
419	0.153099	3	0.0501689		0.0578764	0.153099	6.29E-07
420	0.0498385	3	0.0498385	0.0471917	0.0444374		0.00465073
421	0.0651311	3	0.0528245	0.0322685	0.0651311		0.0174918
427	0.0947985	3	0.0947985	0.0616648	0.0582004		6.65E-05
428	0.0524012	3	0.0445722	0.0463465	0.0524012		4.52E-06

431	0.0201223	3	0.0121381	0.0201223	0.0183686		0.0120791
433	0.0230879	3	0.0220535	0.0230879	0.0197904		3.82E-05
434	0.0899786	3	0.0762484	0.0405274	0.0899786		0.0309977
438	0.0482675	3	0.0422487	0.0461457	0.0482675		0.00112452
440	0.0804662	3	0.0804662	0.0257836	0.0438045		1.97E-05
441	0.0245512	3	0.0245512	0.00860122	0.0192307		2.65E-04
442	0.0343884	3	0.0343884	0.0151143	0.0149097		0.0314487
444	0.0315045	3	0.0236333	0.00961204	0.0315045		0.00600621
445	0.0557127	3	0.0557127	0.043177	0.0446894		8.76E-06
446	0.0395329	3	0.0395329	0.0348566	0.030828		0.00645815
447	0.0495572	3	0.0458203	0.0495572	0.0479839		3.29E-04
449	0.016954	3	0.0139579	0.016954	0.00918556		0.0288877
450	0.181831	4	0.099862	0.181831	0.174142	0.0676732	0.00102459
451	0.122409	4	0.0679015	0.122409	0.119407	0.0412652	0.0019078
456	0.138156	3	0.0960351		0.138156	0.0885918	3.43E-04
458	0.207424	4	0.207424	0.149978	0.201494	0.0191024	0.00560138
461	0.099494	3	0.0646151	0.027483	0.099494		8.25E-06
462	0.149892	3	0.119979	0.119782	0.149892		0.02272
463	0.0662628	2	0.0662628	0.0455311			2.93E-06
464	0.0447184	2	0.0447184	0.0183712			0.0114313
465	0.0532946	4	0.0385626	0.0492488	0.0224938	0.0532946	0.00152874
468	0.0403458	2	0.0403458	0.0363277			0.0373944
469	0.112676	3	0.112676	0.082571	0.077016		2.31E-05
470	0.168334	4	0.161698	0.168334	0.13356	0.147318	0.0107277
471	0.375109	4	0.196536	0.342797	0.375109	0.121826	0.0119021
476	0.0301834	2	0.0301834	0.0130819			0.00109973
477	0.195164	3	0.167032	0.195164	0.111701		0.0102108

480	0.108108	2	0.066685	0.108108			0.00776667
481	0.967045	4	0.459296	0.967045	0.330018	0.235702	4.75E-04
487	0.109215	4	0.109215	0.0998274	0.0837982	0.0564723	0.0205657
488	0.110545	4	0.0388582	0.0724671	0.110545	0.045685	0.0098748
489	0.142252	2		0.142252	0.134331		8.35E-04
492	0.0502821	2		0.0502821	0.0423468		2.56E-06
495	0.050375	2	0.0463337		0.050375		1.95E-05
496	0.114544	2	0.0575608			0.114544	5.51E-06
497	0.110173	2	0.110173			0.0920335	3.50E-06
498	0.0670883	4	0.0174377	0.0255772	0.0513122	0.0670883	0.0182059
499	0.026055	4	0.018398	0.026055	0.0222993	0.00877793	0.0281022
500	0.0563092	3	0.0240117	0.0498454	0.0563092		3.09E-04
501	0.016635	2		0.0106211	0.016635		0.0067772
503	0.0357558	2		0.0168809	0.0357558		0.00123298
508	2.72713	4	1.86989	2.72713	1.62995	1.6598	8.79E-04
509	0.296777	4	0.229965	0.173948	0.296777	0.206738	0.0395152
510	0.0424483	3		0.035096	0.0424483	0.0217893	6.39E-04
511	0.0649414	4	0.0649414	0.0425651	0.0395515	0.0382159	0.0148718
512	0.0401546	3		0.0337909	0.0401546	0.0304265	7.71E-04
513	0.0902286	2		0.0706175	0.0902286		7.22E-04
519	0.215513	4	0.179071	0.126159	0.17226	0.215513	0.00881145
523	0.421946	4	0.388921	0.0664422	0.0621129	0.421946	1.39E-05
525	0.182689	2	0.182689			0.17821	4.49E-04
526	0.187358	2		0.149994	0.187358		4.50E-06
529	0.0821133	3	0.0564339	0.0665859	0.0821133		1.00E-05
531	0.0722473	2			0.0722473	0.0704711	3.49E-07
533	0.0862117	3	0.0209471	0.0862117		0.0743849	6.37E-04

534	0.0347997	2		0.0164474	0.0347997		0.00261232
535	0.836972	4	0.587944	0.55111	0.734439	0.836972	0.00120627
536	0.146649	3	0.142635		0.14586	0.146649	1.82E-05
538	0.0533436	3		0.0352611	0.041569	0.0533436	2.88E-04
539	0.0706838	3		0.0235563	0.0579149	0.0706838	9.60E-06
540	0.817219	4	0.601376	0.817219	0.0950889	0.0946025	1.74E-08
543	0.0726926	2	0.0726926		0.0288937		0.00144815
544	0.21833	3		0.21833	0.21753	0.191814	0.0146145
545	0.149939	3		0.0695973	0.115034	0.149939	0.00753167
547	0.0358148	2	0.0306533		0.0358148		8.16E-05
551	0.0311077	2		0.0311077	0.0160035		0.0137999
553	0.030556	2	0.0268225		0.030556		9.78E-05
555	0.0391904	2	0.022974			0.0391904	0.00868984
559	0.119481	4	0.0419393	0.0295424	0.0604158	0.119481	0.0120399
563	0.0370879	4	0.0138566	0.0156411	0.019045	0.0370879	0.0143668
570	0.0211128	2		0.0211128		0.00681309	0.00745031
573	0.0137995	3	0.0137995	0.0124857	0.0120276		6.37E-05
576	0.132112	2			0.0831849	0.132112	8.52E-09
577	0.0634508	1				0.0634508	1.36E-05
578	0.0524068	1			0.0524068		2.96E-10
579	0.0271509	1			0.0271509		0.00149259
580	0.0436114	1			0.0436114		3.70E-04
582	0.0784255	1		0.0784255			7.35E-08
583	0.0399648	1		0.0399648			1.04E-07
584	0.145263	1		0.145263			4.50E-09
585	0.251372	1		0.251372			0.00167347
586	1.69453	1		1.69453			2.14E-09

587	0.413739	1		0.413739			3.60E-07
588	0.124638	1		0.124638			8.75E-08
589	0.0264337	1		0.0264337			2.12E-05
590	0.0185883	1		0.0185883			4.81E-07
591	0.0584867	1		0.0584867			9.95E-06
592	0.0229441	1		0.0229441			1.85E-13
593	0.0714625	1		0.0714625			5.01E-04
601	0.0300403	1		0.0300403			0.00157159
602	0.0425094	1	0.0425094				5.18E-11
603	0.248844	1	0.248844				1.28E-07
604	0.0959487	1	0.0959487				4.11E-07
605	1.52449	1	1.52449				5.43E-12
606	0.114187	1	0.114187				4.65E-08
607	0.0374952	1	0.0374952				8.40E-08
608	0.0524165	1	0.0524165				1.38E-06
609	0.0842834	1	0.0842834				1.21E-06
610	0.072726	1	0.072726				2.88E-07
611	0.0372721	1	0.0372721				1.90E-05
613	0.0824563	1	0.0824563				1.72E-04
614	0.0541362	1	0.0541362				1.05E-13

Table S6. Homologous protein blasted against the NCBI database for the uncharacterized proteins from common bean (*Phaseolus vulgaris*) database.

Match ID	NCBI Accession	Protein description (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	BLAST	% Identity
78	XP_007143287.1	Uncharacterized protein	AAC23610.1 [beta-type phaseolin storage protein (<i>Phaseolus vulgaris</i>)]	99
			P07219.1 (RecName: Full=Phaseolin, alpha-type; Flags: Precursor)	99
228	XP_007144650.1	Uncharacterized protein	XP_014512682.1 [PREDICTED: sucrose-binding protein-like (<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>)]	81
369	XP_007156915.1	Uncharacterized protein	KHN42001.1 [Vicilin-like antimicrobial peptides 2-2 (<i>Glycine soja</i>)]	81
136 and 140	XP_007133284.1	Uncharacterized proteins	XP_007133285.1 [hypothetical protein PHAVU_011G167000g (<i>Phaseolus vulgaris</i>)]	94
			XP_020208422.1 [acidic endochitinase-like isoform X2 (<i>Cajanus cajan</i>)]	80
			KYP32323.1 [Acidic endochitinase (<i>Cajanus cajan</i>)]	80
			XP_020208421.1 [acidic endochitinase-like isoform X1 (<i>Cajanus cajan</i>)]	80
146	XP_007133285.1	Uncharacterized protein	XP_007133284.1 [hypothetical protein PHAVU_011G166900g (<i>Phaseolus vulgaris</i>)]	94
			XP_020208422.1 [acidic endochitinase-like isoform X2 (<i>Cajanus cajan</i>)]	81
289	XP_007162849.1	Uncharacterized protein	XP_003521438.1 [PREDICTED: enolase (<i>Glycine max</i>)]	97
			NP_001237329.2 [enolase (<i>Glycine max</i>)]	97
			XP_014496230.1 [PREDICTED: enolase (<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>)]	97
			XP_017410054.1 [PREDICTED: enolase (<i>Vigna angularis</i>)]	97
			AAS18240.1 [enolase (<i>Glycine max</i>)]	97
296	XP_007144995.1	Uncharacterized protein	XP_014514693.1 [PREDICTED: calreticulin (<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>)]	94
			XP_017415302.1 [PREDICTED: calreticulin (<i>Vigna angularis</i>)]	94
			BAT95118.1 [hypothetical protein VIGAN_08178300 (<i>Vigna angularis</i> var. <i>angularis</i>)]	94
540	XP_007152200.1	Uncharacterized protein	XP_007152199.1 [hypothetical protein PHAVU_004G109800g (<i>Phaseolus vulgaris</i>)]	100
			XP_014516685.1 [PREDICTED: proline--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial (<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>)]	97
			XP_017440526.1 [PREDICTED: proline--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial (<i>Vigna angularis</i>)]	97
24	XP_007141814.1	Uncharacterized protein	XP_020233761.1 [18.2 kDa class I heat shock protein-like (<i>Cajanus cajan</i>)]	80

123	XP_007143265.1	Uncharacterized protein	XP_014523935.1 [PREDICTED: late embryogenesis abundant protein D-34-like (<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>)]	86
			XP_017413938.1 [PREDICTED: late embryogenesis abundant protein D-34-like (<i>Vigna angularis</i>)]	86
			BAT94077.1 [hypothetical protein VIGAN_08064700 (<i>Vigna angularis</i> var. <i>angularis</i>)]	86
135	XP_007147974.1	Uncharacterized proteins	XP_017413823.1 [PREDICTED: oil body-associated protein 2B-like (<i>Vigna angularis</i>)]	91
223	XP_007154470.1	Uncharacterized proteins	XP_017413056.1 [PREDICTED: late embryogenesis abundant protein D-29 isoform X2 (<i>Vigna angularis</i>)]	74
544, 603 and 605	XP_007152777.1	Uncharacterized proteins	CAC80712.1 [putative dehydrin (<i>Helianthus petiolaris</i>)]	68

Match ID and protein description correspond to the data shown in Table 1.

REFERENCES

- (1) Schmutz, J.; McClean, P. E.; Mamidi, S.; Wu, G. A.; Cannon, S. B.; Grimwood, J.; Jenkins, J.; Shu, S. Q.; Song, Q. J.; Chavarro, C.; Torres-Torres, M.; Geffroy, V.; Moghaddam, S. M.; Gao, D. Y.; Abernathy, B.; Barry, K.; Blair, M.; Brick, M. A.; Chovatia, M.; Gepts, P.; Goodstein, D. M.; Gonzales, M.; Hellsten, U.; Hyten, D. L.; Jia, G. F.; Kelly, J. D.; Kudrna, D.; Lee, R.; Richard, M. M. S.; Miklas, P. N.; Osorno, J. M.; Rodrigues, J.; Thareau, V.; Urrea, C. A.; Wang, M.; Yu, Y.; Zhang, M.; Wing, R. A.; Cregan, P. B.; Rokhsar, D. S.; Jackson, S. A. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat. Genet.* **2014**, 46, 707–713.
- (2) Carvalho, J. V.; de Oliveira Santos, J.; Conte, C.; Pacheco, S.; Nogueira, E. P. L.; Souza, T. P. O.; Faria, J.; Aragao, F. L. Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV051-1) with its non-transgenic counterpart. *Transgenic Res.* **2015**, 24, 813.
- (3) Liu, Y.; Wu, L.; Baddeley, J. A.; Watson, C. A. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agron. Sustainable Dev.* **2011**, 31, 155–172.
- (4) Brigide, P.; Canniatt-Brazaca, S. G.; Silva, M. O. Nutritional characteristics of biofortified common beans. *Food Sci. Technol.* **2014**, 34, 493–500.
- (5) Guajardo-Flores, D.; Garcia-Patino, M.; Serna-Guerrero, D.; Gutierrez-Uribe, J. A.; Serna-Saldivar, S. O. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chem.* **2012**, 134, 1312–1319.
- (6) Garcia-Lafuente, A.; Moro, C.; Manchon, N.; Gonzalo-Ruiz, A.; Villares, A.; Guillamon, E.; Rostagno, M.; Mateo-Vivaracho, L. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chem.* **2014**, 161, 216–223.
- (7) Zargar, S. M.; Nazir, M.; Rai, V.; Hajduch, M.; Agrawal, G. K.; Rakwal, R. Towards a common bean proteome atlas: looking at the current state of research and the need for a comprehensive proteome. *Front. Plant Sci.* **2015**, 6, 1.

- (8) De La Fuente, M.; Borrajo, A.; Bermudez, J.; Lores, M.; Alonso, J.; Lopez, M.; Santalla, M.; De Ron, A. M.; Zapata, C.; Alvarez, G. 2- DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J. Proteomics*. **2011**, 74, 262–267.
- (9) De la Fuente, M.; Lopez-Pedrouso, M.; Alonso, J.; Santalla, M.; De Ron, A. M.; Alvarez, G.; Zapata, C. In-depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Food Technol. Biotechnol.* **2012**, 50, 315–325.
- (10) Lopez-Pedrouso, M.; Bernal, J.; Franco, D.; Zapata, C. Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 7200–7208.
- (11) Marsolais, F.; Pajak, A.; Yin, F. Q.; Taylor, M.; Gabriel, M.; Merino, D. M.; Ma, V.; Kameka, A.; Vijayan, P.; Pham, H.; Huang, S. Z.; Rivoal, J.; Bett, K.; Hernandez-Sebastian, C.; Liu, Q. A.; Bertrand, A.; Chapman, R. Proteomic analysis of common bean seed with storage protein deficiency reveals up-regulation of sulfur-rich proteins and starch and raffinose metabolic enzymes, and down-regulation of the secretory pathway. *J. Proteomics*. **2010**, 73, 1587–1600.
- (12) Parreira, J. R.; Bouraada, J.; Fitzpatrick, M. A.; Silvestre, S.; da Silva, A. B.; da Silva, J. M.; Almeida, A. M.; Fevereiro, P.; Altelaar, A. F. M.; Araujo, S. S. Differential proteomics reveals the hallmarks of seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Proteomics*. **2016**, 143, 188–198.
- (13) Balsamo, G. M.; Valentim-Neto, P. A.; Mello, C. S.; Arisi, A. C. M. Comparative proteomic analysis of two varieties of genetically modified (GM) Embrapa 5.1 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their non-GM counterparts. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 10569–10577.
- (14) Mojica, L.; de Mejia, E. G. Characterization and comparison of protein and peptide profiles and their biological activities of improved common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2015**, 70, 105–112.

- (15) FAOSTAT. Statistics Division of the FAO; FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed October 2016).
- (16) Brazil, MAPA. Projeções do Agronegócio Brasil 2012/13 a 2022/23/Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acessoria de Gestão Estratégica; Brasilia:MAPA/ACS, **2013**; p 96.
- (17) de Faria, L. C.; Santos Melo, P. G.; Pereira, H. S.; del Peloso, M. J.; Braga Pereira Bras, A. J.; Alves Moreirad, J. A.; Lemos de Carvalho, H. W.; Melo, L. C. Genetic progress during 22 years of improvement of carioca-type common bean in Brazil. *Field Crops Research*. **2013**, 142, 68–74.
- (18) Melo, L. C.; Del Peloso, M. J.; Pereira, H. S.; de Faria, L. C.; Caprio da Costa, J. G.; Cabrera Diaz, J. L.; Rava, C. A.; Wendland, A.; Barbosa Abreu, A. d. F. BRS Estilo - Common bean cultivar with Carioca grain, upright growth and high yield potential. *CBAB, Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2010**, 10, 377–379.
- (19) Pereira, H. S.; Wendland, A.; Melo, L. C.; Del Peloso, M. J.; de Faria, L. C.; Caprio da Costa, J. G.; Nascente, A. S.; Cabrera Diaz, J. L.; Lemos de Carvalho, H. W.; de Almeida, V. M.; Pereira de Melo, C. L.; da Costa, A. F.; Prucoli Posse, S. C.; de Souza, J. F.; Barbosa Abreu, A. d. F.; de Sousa Magaldi, M. C.; Guimaraes, C. M.; de Oliveira, J. P. BRS Notavel: a medium-early-maturing, disease-resistant Carioca common bean cultivar with high yield potential. *CBAB, Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2012**, 12, 220–223.
- (20) de Faria, L. C.; Del Peloso, M. J.; da Costa, J. G. C.; Rava, C. A.; Carneiro, G. E. S.; Soares, D. M.; Díaz, J. L. C.; Silva, H. T.; Sartorato, A.; de Faria, J. C.; Zimmermman, F. J. P. ‘BRS Vereda’: new common bean cultivar of the “Rosinha” commercial grain type. *CBAB, Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2004**, 4, 264–266.
- (21) Aragao, F. J. L.; Faria, J. C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nat. Biotechnol.* **2009**, 27, 1086–1088.

- (22) Valentim-Neto, P. A.; Rossi, G. B.; Anacleto, K. B.; de Mello, C. S.; Balsamo, G. M.; Arisi, A. C. M. Leaf proteome comparison of two GM common bean varieties and their non-GM counterparts by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 927–932.
- (23) Ferrari, C. S.; Amaral, F. P.; Ferreira Bueno, J. C.; Scariot, M. C.; Valentim-Neto, P. A.; Maisonnave Arisi, A. C. Expressed proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in maize (DKB240) roots-bacteria interaction revealed using proteomics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *174*, 2267–2277.
- (24) R Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, 2013.
- (25) Marquezi, M.; Gervin, V. M.; Watanabe, L. B.; Bassinello, P. Z.; Amante, E. R. Physical and chemical properties of starch and flour from different common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Braz. J. Food Technol.* **2016**, *19*, 8.
- (26) de Mello, C. S.; Van Dijk, J. P.; Voorhuijzen, M.; Kok, E. J.; Arisi, A. C. M. Tuber proteome comparison of five potato varieties by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 3928–3936.
- (27) Valdes, A.; Simón, C.; Ibañez, C.; Garcia-Cañas, V. Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 2–15.
- (28) Vidal, N.; Barbosa, H.; Jacob, S.; Arruda, M. Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses. *Food Chem.* **2015**, *180*, 288–294.
- (29) Yin, F. Q.; Pajak, A.; Chapman, R.; Sharpe, A.; Huang, S.; Marsolais, F. Analysis of common bean expressed sequence tags identifies sulfur metabolic pathways active in seed and sulfur-rich proteins highly expressed in the absence of phaseolin and major lectins. *BMC Genomics.* **2011**, *12*, 1.

- (30) Natarajan, S. S.; Pastor-Corrales, M. A.; Khan, F. H.; Garrett, W. M. Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *J. Basic Appl. Sci.* **2013**, *9*, 424–437.
- (31) Dunwell, J. M.; Purvis, A.; Khuri, S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry.* **2004**, *65*, 7– 17.
- (32) Mirkov, T. E.; Chrispeels, M. J. Mutation of Asn(128) to Asp of *Phaseolus-vulgaris*-Leukoagglutinin (Pha-L) eliminates carbohydratebinding and biological-activity. *Glycobiology.* **1993**, *3*, 581–587.
- (33) Carrasco-Castilla, J.; Javier Hernandez-Alvarez, A.; JimenezMartinez, C.; Jacinto-Hernandez, C.; Alaiz, M.; Giron-Calle, J.; Vioque, J.; Davila-Ortiz, G. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chem.* **2012**, *131*, 1157–1164.
- (34) De Mejia, E. G.; Valadez-Vega, M. D. C.; Reynoso-Camacho, R.; Loarca-Pina, G. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2005**, *60*, 137–145.
- (35) Schupp, N.; Ziegler, P. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 1471–1484.
- (36) Hwang, S. K.; Singh, S.; Cakir, B.; Satoh, H.; Okita, T. W. The plastidial starch phosphorylase from rice endosperm: catalytic properties at low temperature. *Planta.* **2016**, *243*, 999–1009.
- (37) Seidel, C.; Walz, A.; Park, S.; Cohen, J. D.; Ludwig-Muller, J. Indole-3-acetic acid protein conjugates: Novel players in auxin homeostasis. *Plant Biol.* **2006**, *8*, 340–345.
- (38) Goyal, K.; Walton, L. J.; Tunnacliffe, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* **2005**, *388*, 151– 157.

- (39) Barrera-Figueroa, B. E.; Pena-Castro, J. M.; Acosta-Gallegos, J. A.; Ruiz-Medrano, R.; Xoconostle-Cazares, B. Isolation of dehydration-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 late embryogenesis abundant mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars. *Funct. Plant Biol.* **2007**, *34*, 368–381.
- (40) Battaglia, M.; Covarrubias, A. A. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 190.
- (41) Krishnan, H. B.; Natarajan, S. S.; Oehrle, N. W.; Garrett, W. M.; Darwish, O. Proteomic analysis of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds reveals the accumulation of numerous stress-related proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4572–4581.

CAPÍTULO III

***Artigo submetido**

Gabriela Barbosa Rossi, Siluana Katia Tischer Seraglio, Ana Carolina de Oliveira Costa, Isabela Maia Toaldo, Josias Correa de Faria, Ana Carolina Maisonnave Arisi. Protein profile and antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.).

Protein profile and antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.).

Gabriela Barbosa Rossi[†], Siluana Katia Tischer Seraglio[†], Ana Carolina de Oliveira Costa[†],
Isabela Maia Toaldo[†], Josias Correa de Faria[§], Ana Carolina Maisonnave Arisi^{†*}

[†]CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

[§]Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil.

Corresponding Author

*E-mail: ana.arisi@ufsc.br. Phone: +554837215382.

ORCID

Ana Carolina Maisonnave Arisi: 0000-0001-6077-7960

ABSTRACT

Common bean grains (*Phaseolus vulgaris* L.) are an economical source of protein and rich in bioactive compounds with antioxidant activity. In this work, we evaluated processed grains from two common bean cultivars regarding to protein profile and antioxidant capacity before and after enzymatic digestion in vitro. We provided protein maps by two-dimensional electrophoresis (2-DE) of grains germinated during 36 h and 72 h. The principal component analysis (PCA) showed that protein expression had more variation on germination times than the cultivar ones. Grains germinated for 36 h showed greater antioxidant capacity compared to germination for 72 h and cooking, before and after enzymatic digestion. In protein isolates, cooking associated with digestion provided better results. Our study demonstrated that cultivars from different commercial groups could present interesting results regarding the antioxidant capacity in processed common bean grains.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, processed grains, protein profile, antioxidant capacity.

1 INTRODUCTION

Dry grains of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) have become one of the main food crops presenting a variety of colors, sizes and shapes. In addition they represent an economical source of calories and vegetable protein¹. They are rich in bioactive compounds, such as peptides and polyphenols that have important biological activities with beneficial effects on human health²⁴. Polyphenols founded in common beans act to reduce the risk of some types of cancer and diseases such as diabetes, Alzheimer's and Parkinson's^{5,6}. Peptides have shown potential to inhibit markers of type 2 diabetes, hypertension and oxidative stress⁷.

The consumption of bean grains generally occurs after some type of thermal processing, such as cooking⁸. Cooking process can increase texture, flavor and color to dry grains, improves the digestibility of compounds such as proteins and starch and reduces anti-nutritional compounds^{8,9}. These compounds are also reduced during germination, considered a simple and effective process that has been applied and studied in common bean grains, mainly as a strategy for increasing antioxidant capacity¹⁰. Cooking and germination cause changes in the antioxidant activity of bioactive compounds however, these changes depend on several factors such as the cultivar used and the condition applied.^{6,8} In vitro digestion models are widely used and simulate the passage through the gastrointestinal system and can evaluate the nutrients available after the consumption of processed grains^{11,12}. An increase in the antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* L. grains is observed in the association of these models with processes such as cooking^{13,14}.

Brazil has stood out in the world scene for many years as a consumer and producer of dry beans¹⁵ and several improved cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. are available for planting in the country. In our previous study, grain proteomes of four improved Brazilian common bean cultivars, 'BRS Sublime', 'BRS Estilo', 'BRS Esteio' and 'BRS Vereda' were compared and 32 proteins differentially accumulated among these cultivars were identified¹⁶. In the present study, the objective was to compare two of these cultivars ('BRS Sublime' and 'BRS Vereda') regarding the protein profile of germinated grains and to determine the antioxidant capacity in germinated grains and cooked grains, and in their respective protein isolates, before and after enzymatic digestion in vitro.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Grains of two common bean (*P. vulgaris* L.) cultivars ('BRS Vereda' and 'BRS Sublime') grown in 2018 and 2019, side by side in a greenhouse, were provided by Embrapa Arroz e Feijao, Santo Antônio de Goiás, Goiás State, Brazil (Rice and bean unit). The grains were stored in plastic packaging at -4 °C until the time of analysis.

2.2 Sample preparation

2.2.1 Germination of common bean grains

For the analysis of the protein profile, approximately 300 grains of common bean were used for each cultivar divided into three pools of 50 grains for each time, 36 h and 72 h (Figure S1). Disinfection of grains was carried out following procedure of previous established¹⁶. After disinfection, the grains were washed with distilled water until neutral pH, and distributed among germination papers moistened with distilled water, in a paper: water ratio of 1: 2 (w / v). The papers containing the grains were rolled up, placed in plastic bags and distributed in a germination chamber for 36 h and 72 h, at 25 °C ± 2 ° C, in the dark. After germination, part of the germinated grains was separated to measure the length of the hypocotyl and primary root of the seedlings with a digital calliper (Digital calliper 0-150 mm, China). The remainder of the germinated grains were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

For the determination of antioxidant capacity, approximately 150 grains of beans were used for each cultivar, divided into three pools of 25 grains for each time (36 h and 72 h) and germination followed as previously mentioned. After germination, germinated grains were ground using an analytical mill (IKA, Staufen, Germany), homogenized with mortar and pestle, separated into tubes and stored at -20 °C (Table S1).

2.2.2 Cooking of common bean grains

The preparation of cooked beans occurred according to the previous method¹⁸, with modifications. Approximately 150 grains of each cultivar were soaked in distilled water for 16 h, in a grain: water ratio of 1: 4 (w / v). For cooking, the water was discarded and the swollen grains were weighed and mixed again with distilled water, in the same proportion (1: 4, w / v). The grains of each cultivar were cooked in an electric pan for 27 min, counted from the beginning of boiling. After cooking, the water was discarded and the cooked grains were

macerated and homogenized using mortar and pestle and then transferred to tubes and stored at -20 °C until the time of analysis (Table S1).

2.2.3 Protein extraction

The extraction of total soluble proteins was performed to compare the protein profile in germinated grains for 36 h and 72 h, in two common bean cultivars (Figure S1). The samples were ground in liquid nitrogen using an analytical mill (IKA, Staufen, Germany) and the extraction proceeded according to the previous method ¹⁶.

2.2.4 Phenolic compounds extraction

The extraction of phenolic compounds was performed only for samples that were not submitted to enzymatic digestion *in vitro* (Table S1). Phenolic compounds from cooked and germinated common bean grains were extracted according to the previous method ¹⁹, with modification in the final concentration for 100 mg of sample per mL of solution.

2.2.5 Protein isolates extraction

Protein isolates from cooked and germinated common bean grains were obtained according to the previous method ¹⁴, with modifications. For cooked grains, 10 g of sample were used and for germinated grains, 3 g of sample, as observed in previous tests (Table S1). To each sample, ultrapure water was added, in the grain: ultrapure water ratio of 1: 2 (w / v) followed by homogenization for 1 min. The pH of the extract was adjusted to 8.0 with NaOH solution (1M) and the extraction of proteins occurred under shaking in shaker (IKA, Staufen, Germany), for 2 h at 35 °C and 200 rpm, followed by centrifugation at 5,000 x g for 15 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatants were transferred to a new tube and the precipitates were extracted again, as already mentioned. The supernatants resulting from the two extractions were combined, the pH was adjusted to 4.3 with HCl solution (1M) and the samples were centrifuged at 10,000 x g for 20 min at 4 °C. The upper phase was discarded, the precipitates were dried in a shaker (IKA, Staufen, Germany) for 30 min at 35 °C and stored at -20 °C until the time of analysis.

2.3 Enzymatic digestion *in vitro*

For enzymatic digestion, the samples (cooked and germinated common bean grains) and their respective protein isolates were suspended in distilled water. The enzymes from the oral, gastric and intestinal phases were added according to the previous methods ^{11,14} and with final

concentration in the intestinal phase of 0.2 g of sample per mL of enzyme extract. After in vitro digestion, the samples were subjected to thermal shock and centrifugation according to the previous method ¹⁴ and then stored at -20 °C.

2.4 Quantification of soluble proteins

For the analysis of the protein profile, the quantification of soluble proteins (SP) occurred according to the previous method ¹⁶.

For the determination of antioxidant capacity, the quantification of soluble proteins was performed before and after enzymatic digestion in vitro. For samples not submitted to digestion, protein isolates were suspended in ultrapure water (pH 6.5) at a concentration of 100 mg/mL and for samples submitted to digestion the final concentration was 200 mg/mL. Quantification was performed with Bio-Rad Protein Assay (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's instructions on the Hitachi U2910 spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at 595 nm.

2.5 Two-dimensional electrophoresis (2-DE)

Two-dimensional electrophoresis was performed according to the previous method ¹⁶ (Figure S1).

2.6 Image and Data Analysis.

The digitalization and analysis of the images followed according to the previous method and the following parameters for spot detection were used: smoth ≥ 30 , area min. ≥ 11 and saliency ≥ 3 . The relative spot volume (% Vol) was compared among the germination times with ANOVA by ImageMaster software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). For this, spot volumes were considered with significant differences ($p < 0.05$) among mean value of the triplicate of gels of each germination time.

2.7 Determination of antioxidant capacity

All spectrophotometric methods used to determine the antioxidant capacity of processed common bean grains and their respective protein isolates, before and after enzymatic digestion in vitro, were performed according to the previous method ²⁰, with modifications (Figure 1).

2.7.1 Folin-Ciocalteu reducing capacity

The reducing capacity of the samples was determined by the Folin-Ciocalteu method and the results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of sample (cooked or germinated grains) or per g of soluble protein (protein isolates from cooked or germinated grains).

2.7.2 DPPH free radical scavenging assay

The scavenging ability of the samples was determined by the DPPH method, and the results obtained were expressed as mg equivalent to gallic acid equivalents (GAE) per g of sample (cooked or germinated grains) or per g of soluble protein (protein isolates from cooked or germinated grains).

2.7.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The reducing ability of the samples was also determined by the FRAP method. The results obtained were expressed in μmol equivalent to the Trolox (TE) per g of sample (cooked or germinated grains) or per g of soluble protein (protein isolates from cooked or germinated grains).

2.8 Statistics

All samples were carried out in triplicate ($n=3$) and the results expressed as mean \pm standard deviation (SD). To compare the antioxidant capacity of cooked and germinated common bean grains, the results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. For the comparison of samples before and after enzymatic digestion *in vitro*, the results were subjected to the t test. Statistical analyzes were performed using the Statistica v 7.0 software (Statsoft, Tulsa, OK), where differences were considered statistically significant at the 5% level ($p < 0.05$). For the principal component analysis (PCA) with germinated common bean grains, the volume percentages of 232 matched spots in the 12 gels obtained in 2-DE were used. The relative volumes of the matched spots were \log_2 transformed, centered in relation to the median, normalized and then submitted to PCA using the R language²¹.

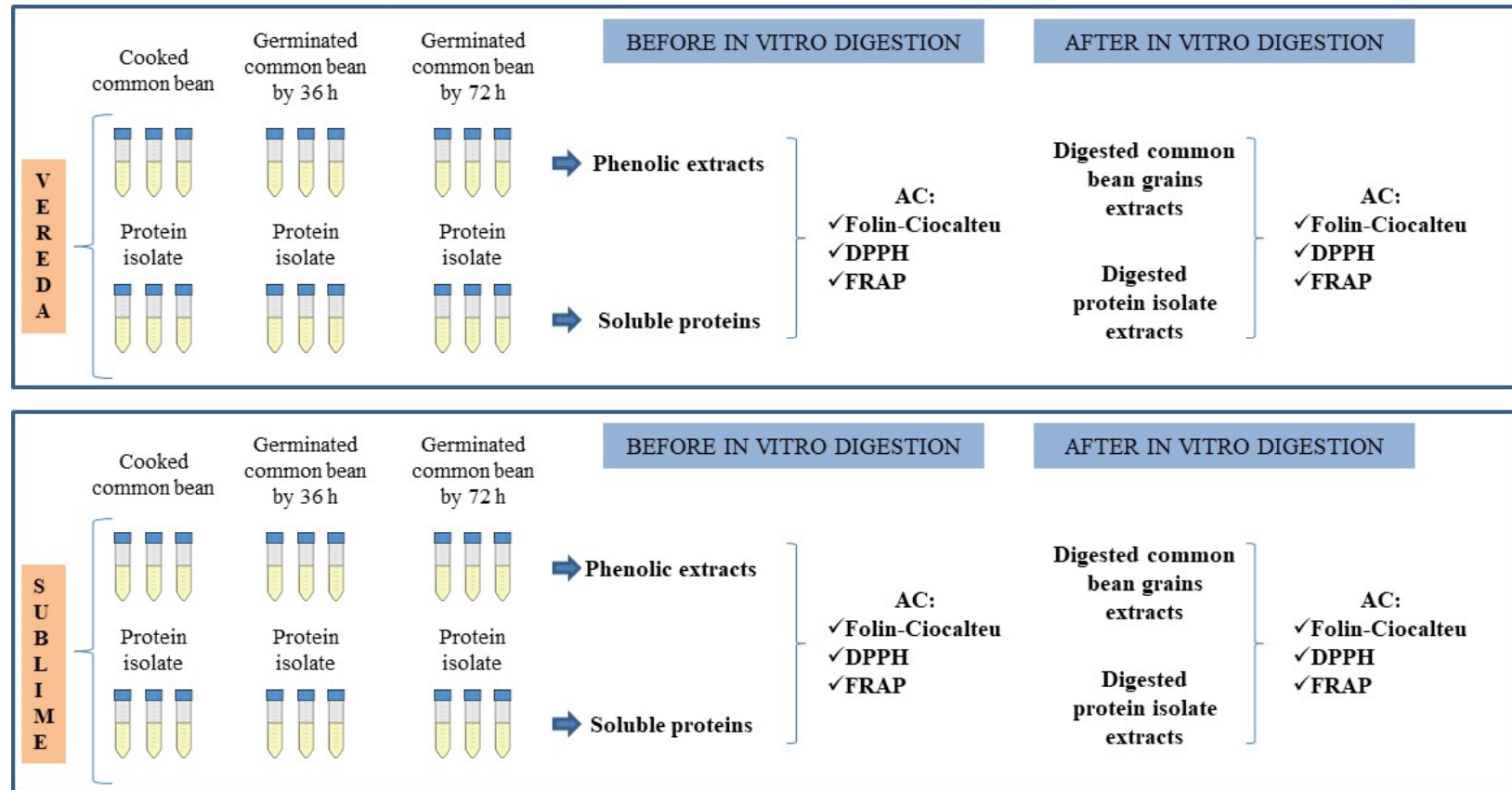


Figure 1. Determination of the antioxidant capacity (AC) in cooked and germinated common bean and their respective protein isolates by different spectrophotometric methods.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Comparison of germinated grains protein profile by 2-DE and PCA

Grains germinated by 36 h and 72 h from 'BRS Vereda' and 'BRS Sublime' cultivars presented germination percentage around 77-87 % and 69-52%, respectively. The size of seedling ranged between 0.8 to 3.7 and 0.9 to 4.3 cm and average values of total soluble protein ranged between 11.4 to 12.2 and 8.5 to 9.5 mg/g of sample, respectively.

Approximately 776 ± 117 spots were detected in germinated grains by 36 and 72 h, in 'BRS Vereda' and 'BRS Sublime' cultivars (Table 1) while in the dry grains of these cultivars were detected an average of 537 ± 39 spots¹⁶. The correlation coefficients of scatter plots among the gels of each sample ranged from 0.89 and 0.97, demonstrating acceptable repeatability with respect to the staining step in 2-DE analysis (Table 1).

The analysis of variance showed that for the 'BRS Vereda' cultivar, 422 spots were differentially expressed ($p < 0.05$) between germination times. For the 'BRS Sublime' cultivar, 233 spots were differentially expressed between germination times. The representative maps of common bean germinated grains protein profile are shown in Figure 2. We observed a decrease in the intensity of spots with molecular masses above 37 kDa with the increase germination time and an increase in the intensity of the spots with relative molecular masses about of 18 kDa and 25 kDa. In a previous study, we identified these proteins as isoforms of phaseolins, main storage proteins in common bean seeds¹⁶. Phaseolin with molecular mass about 50 kDa was identified in germinated common bean grains by 0, 24, 48 and 72 h³. The electrophoretic profile by SDS-PAGE showed a decrease in the intensity of phaseolin band after 24 h of germination and these authors suggested a degradation of this protein during this period³. In rice seeds, breakdown products of storage proteins increased during germination²². In common beans germinated by 4, 6 and 8 days there were also a reduction in density of protein bands of 31, 45, 47 and 57 kDa, during germination and a smear of lower molecular mass polypeptides²³.

Table 1. Comparison by 2-DE among the three gels (A, B and C) of each sample (V: 'BRS Vereda', S: 'BRS Sublime') and among the germination times of each cultivar.

Samples	Number of spots	Number of spots (Average±SD)	CV (%)	Matched spots ^a		Matched spots ^b		Slope	<i>r</i>
				(%)	Slope	(%)	Slope		
V36 h A	668			99	0.72	0.97	99	0.72	0.97
V36 h B ^{c,d}	946	822±141	17.20	89	-	-	95	-	-
V36 h C	851			96	0.94	0.97	97	0.94	0.97
V72 h A	710			99	0.81	0.94	99	0.80	0.80
V72 h B ^c	864	809±86	10.59	94	-	-	98	1.02	0.77
V72 h C	852			95	0.94	0.97	97	0.95	0.81
S36 h A	748			89	1.12	0.89	94	0.90	0.70
S36 h B	591	713±109	15.31	96	0.74	0.93	98	0.53	0.71
S36 h C ^c	801			88	-	-	98	0.80	0.82
S72 h A ^{c,d}	884			86	-	-	95	-	-
S72 h B	623	761±131	17.23	96	0.70	0.95	97	0.70	0.95
S72 h C	776			97	0.81	0.96	98	0.81	0.96

^aMatched spots among gels with the same germination time. ^bMatched spots among gels with different germination times. ^c Reference gel of each germination time in the two cultivars. ^d Reference gel of each cultivar.

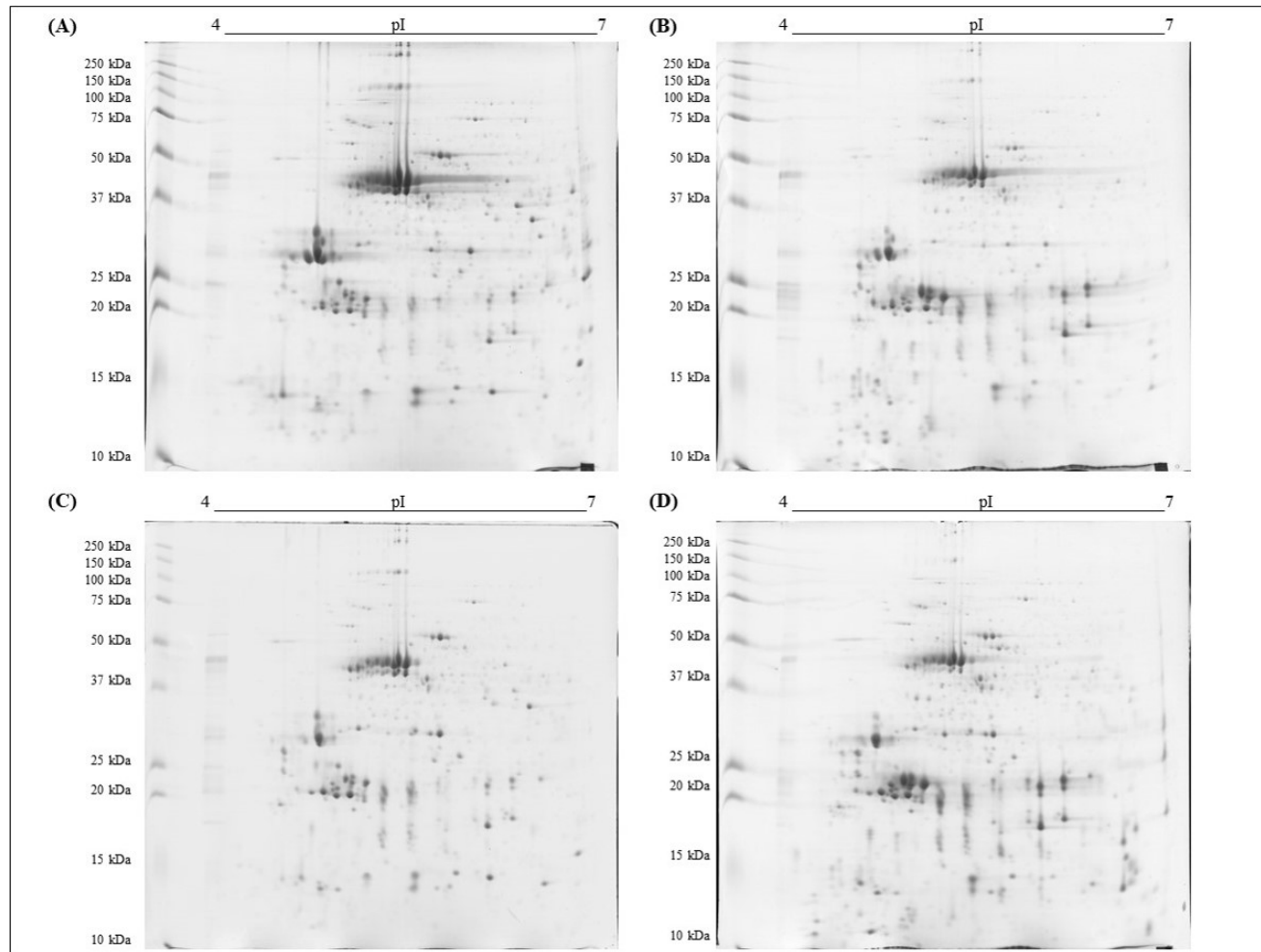


Figure 2. 2-DE gels obtained from 250 μ g of grain proteins germinated for 36h and 72h, from two common bean cultivars. (A): reference gel of germinated grains for 36 hours, cultivar 'BRS Vereda'; (B): reference gel of germinated grains for 72 hours, cultivar 'BRS Vereda'; (C): reference gel of germinated grains for 36 hours, cultivar 'BRS Sublime'; (D): gel reference of germinated grains for 72 hours, cultivar 'BRS Sublime'.

In PCA we compared the differences in the percentage of volume (% Vol) of 232 matched spots all 12 2-DE maps and the first two components explained 59.14% of the dataset variation (Figure 3). Gels with the same germination time were clearly grouped in the first principal component (PC1). The germination time indicated more similarity between different cultivars than different germination times for the same cultivar. The 'BRS Sublime' cultivar showed greater similarity in the intensity of the spots between germination times than the 'BRS Vereda' cultivar. PCA grouped these cultivars in the comparison of the grain proteome of four common bean cultivars, although they belong to different commercial groups ¹⁶. In the comparison the protein profile of grains and leaves of two genetically modified common bean varieties (Embrapa 5.1) with their non-GM counterparts, by PCA, the authors observed that variability was more influenced by varieties than by genetic transformation ^{24,25}.

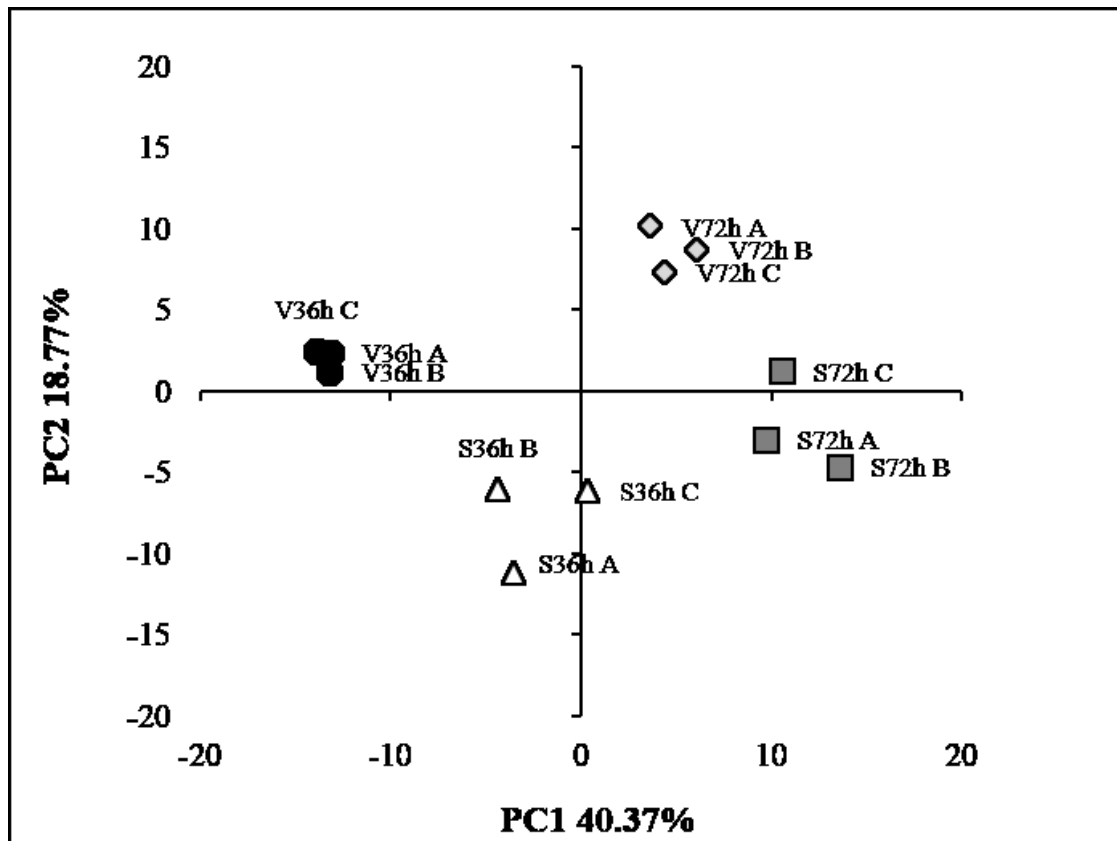


Figure 3. PCA for volume percentage of 232 matched spots of 2-DE gels from germinated grains of two common bean cultivars. (V 36 h): grains of 'BRS Vereda' cultivar germinated by 36 h, (V 72 h): grains of 'BRS Vereda' cultivar germinated by 72 h, (S 36 h): grains of 'BRS Sublime' cultivar germinated by 36 h and (S 72 h): grains of 'BRS Sublime' cultivar germinated by 72 h. Letters A, B and C refer to the triplicate of each cultivar gels.

3.2 Determination of the antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars, before and after enzymatic digestion in vitro

In our study, three processing conditions were applied to common bean grains and the antioxidant capacity before and after in vitro digestion was determined by three methods.

Figures 4 and 5 show the antioxidant capacity of cooked common bean grains and germinated by 36 and 72 h common beans grains, and their respective protein isolates, before and after enzymatic digestion in vitro. Different samples had different responses to the types of processing applied to common bean grains. The phenolic extracts of germinated grains by 36 h (samples before in vitro digestion) showed greater antioxidant capacity in the three spectrophotometric methods used (Figure 4). The values obtained in the two common bean cultivars in these samples were the same for the Folin Ciocalteu and DPPH methods (2.2 and 0.5 mg of GAE per g of sample, respectively). For the FRAP method, the 'BRS Sublime' cultivar showed greater antioxidant capacity (5.2 $\mu\text{mol TE per g sample}$) than the 'BRS Vereda' cultivar (4.0 $\mu\text{mol TE per g sample}$). In the enzymatic extracts (samples after in vitro digestion), germinated grains by 36 h showed higher antioxidant capacity in DPPH and FRAP methods in both cultivars. For the Folin Ciocalteu method, there was a statistical difference only between cooked and germinated grains. These results suggest that germinated grains by 36 h could be more interesting with regard to antioxidant capacity than germinated grains by 72 h and cooked grains, in the two cultivars analyzed. In protein concentrates of germinated black beans, the antioxidant capacity increased considerably from zero to 24 h, decreased from 24 to 48 h and from 48 to 72 h there was no statistical difference ³. We also observed a reduction in the antioxidant capacity between 36 h and 72 h of germination for phenolic and enzymatic extracts of common bean grains. In germinated common beans by 4, 6 and 8 days, there was a reduction in antioxidant capacity only after 8 days of germination ²³. The antioxidant capacity in germinated common bean grains by 5 days was lower than in non-germinated grains ¹⁷. In the comparison of the same process, before and after in vitro digestion, 83% of the samples showed greater antioxidant capacity before digestion, in phenolic extracts. This result was already expected, as these samples were extracted with chemical solvent. Polyphenols extraction in common beans is usually carried out with a methanol or acetone systems, with concentrations ranging from 50 to 80% together with water and acid ⁶.

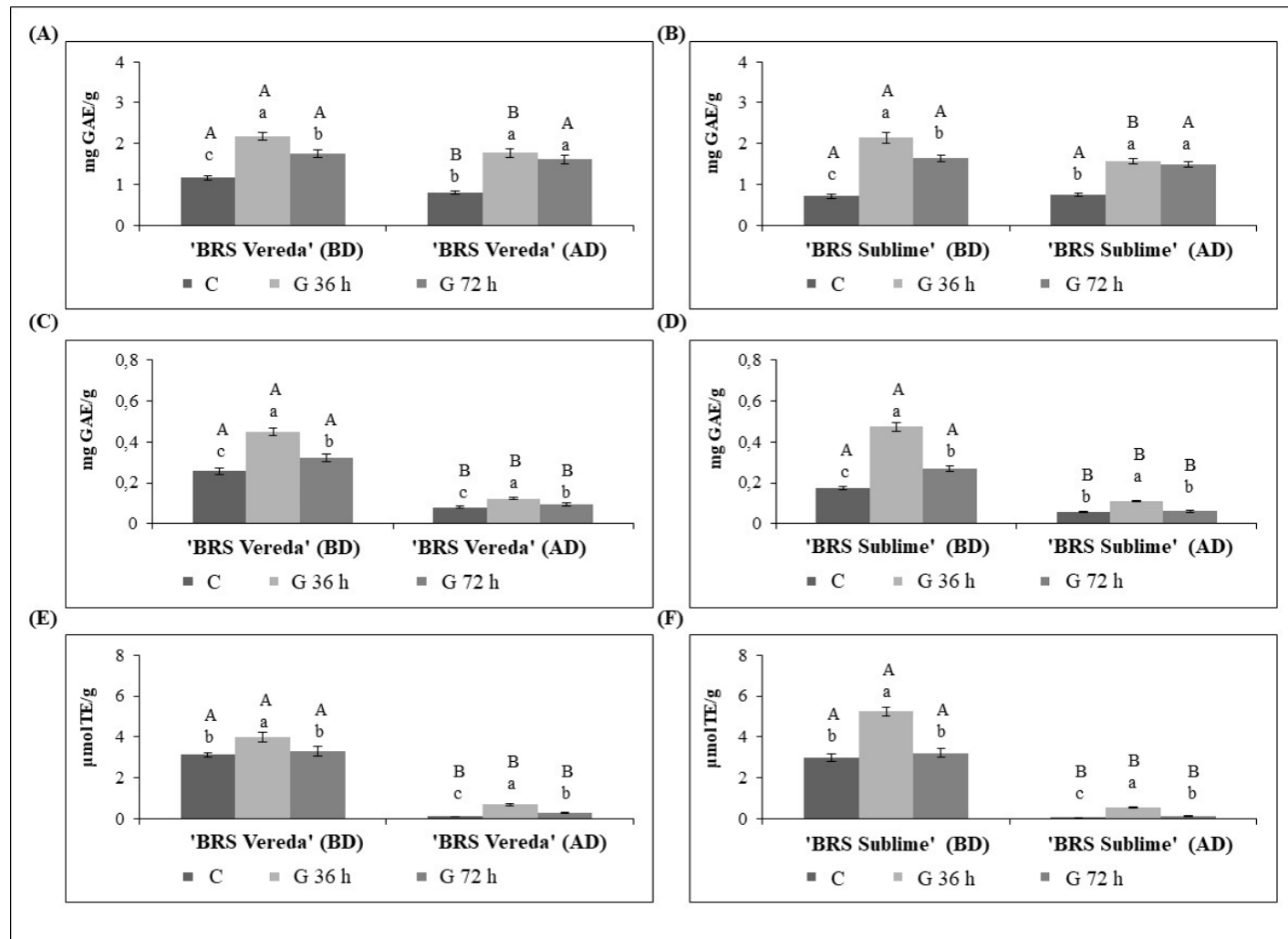


Figure 4. Antioxidant capacity of cooked (C) and germinated common bean grains (G 36 h and G 72h), from two cultivars ('BRS Vereda' and 'BRS Sublime'), before and after in vitro digestion (BD: before digestion, AD: after digestion), by different methods. The values represent the mean \pm SD (n = 3). Determination of antioxidant capacity by the Folin-Ciocalteu method (A) and (B); DPPH (C) and (D), both expressed in milligrams equivalent to gallic acid per gram of sample (mg GAE/g) and FRAP (E) and (F), expressed in micromol equivalent to Trolox per gram of sample (μ mol TE/g).

In the protein isolates, the cooked grains showed greater antioxidant capacity (Figure 5), for the 'BRS Vereda' cultivar (3.914.1 mg GAE per g of soluble protein, 28.4119.4 mg of GAE per g of soluble protein and 43.0138.1 μ mol TE per g of soluble protein, for DPPH, Folin Ciocalteu and FRAP, before and after digestion, respectively). In the comparison of the same process, before and after in vitro digestion, 94% of the samples showed a significant increase in antioxidant capacity after digestion, in enzymatic extracts. Gastrointestinal simulation performed with the enzymes pepsin-pancreatin is a model widely used to obtain bioactive peptides from common bean proteins ². Our results show that for the 'BRS Vereda' cultivar, cooking and enzymatic hydrolysis were important to obtain peptides with antioxidant capacity. In protein concentrates of cooked common beans, the antioxidant capacity increased after hydrolysis with pepsin and pancreatin, compared to their unhydrolyzed protein concentrates ¹³. The same was observed in two of five varieties of pre-cooked and hydrolyzed common beans, compared to hydrolyzed raw beans ¹⁴. These authors mentioned that protein denaturation promoted by thermal processing allows enzymes to act more efficiently in proteins, influencing the release of bioactive peptides, which may have antioxidant capacity when released from native protein ¹⁴. In the 'BRS Sublime' cultivar, the antioxidant capacity values varied according to the method used for each process applied to the grains. Although thermal processing is beneficial for enzymatic hydrolysis, globular proteins such as phasolin have different susceptibilities to hydrolysis, depending on the cultivar ².

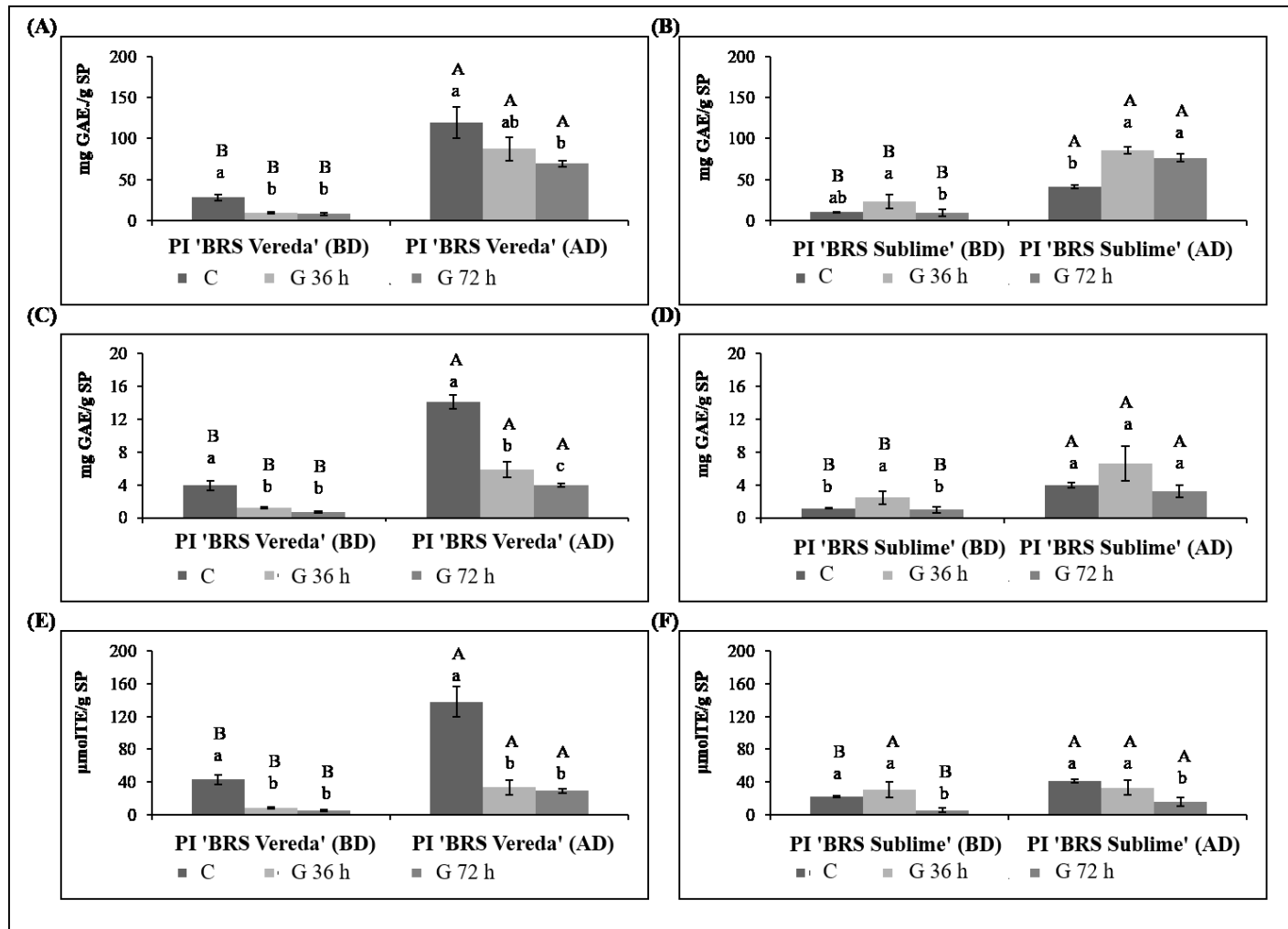


Figure 5. Antioxidant capacity of protein isolates (PI) from cooked (C) and germinated common bean grains (G36 h and G 72 h), from two cultivars ('BRS Vereda' and 'BRS Sublime'), before and after in vitro digestion (BD: before digestion, AD: after digestion), by different methods. The values represent the mean \pm SD ($n = 3$). Determination of antioxidant capacity by the Folin-Ciocalteu method (A) and (B); DPPH (C) and (D), both expressed in milligrams equivalent to gallic acid per gram of soluble protein (mg GAE/SP) and FRAP (E) and (F), expressed in micromol equivalent to Trolox per gram of soluble protein ($\mu\text{molTE/SP}$).

Our study provided 2-DE protein maps of germinated grains in two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L and PCA showed that protein expression was more influenced by germination times than by cultivars. Regarding the antioxidant capacity, this was the first study that evaluated cooking and germination together, in phenolic and enzymatic extracts and in protein isolates and their enzymatic extracts, for grains of two common bean cultivars. Of the three conditions evaluated, germination for 36 h would be the most interesting process in terms of antioxidant capacity for common bean grains, both in phenolic extracts (samples before digestion) and in a mixture of bioactive compounds (samples after digestion). For protein isolates, cooking associated with digestion would be more advantageous. The 'BRS Vereda' cultivar, belonging to the pink grain type, showed higher antioxidant capacity in most of the analyzed samples (data not shown). These results suggest that common bean cultivars from different commercial groups, such as the pink, need to be further studied, as they can present interesting results for different bioactive compounds in processed common bean grains.

ABBREVIATIONS USED

PCA: principal component analysis, 2-DE: two-dimensional gel electrophoresis, SP: soluble proteins, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, FRAP: ferric reducing antioxidant power, GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox Equivalents, GM: genetically modified.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Caroline M. Stein and Karina G. Silveira for technical support.

FUNDING SOURCES

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

SUPPORTING INFORMATION DESCRIPTION

Supplemental Table S1. Organization and storage of cooked and germinated bean grains, to determine the antioxidant capacity, according to the subsequent analyzes.

Supplemental Figure S1. Experimental design of total soluble protein extraction and 2-DE for germinated grains of two common bean cultivars, 'BRS Vereda' and 'BRS Sublime'.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Organization and storage of cooked and germinated bean grains, to determine the antioxidant capacity, according to the subsequent analyzes.

	Samples before in vitro digestion		Samples after in vitro digestion	
	Phenolic extracts (g)	Protein isolates (g)	Digested germinated and cooked grains (g)	Digested protein isolates (g)
Cooked grains	0.5	10	0.5	10
Vereda	0.5	10	0.5	10
	0.5	10	0.5	10
Cooked grains	0.5	10	0.5	10
Sublime	0.5	10	0.5	10
	0.5	10	0.5	10
Germinated grains	0.5	3	0.5	3
(36 h)	0.5	3	0.5	3
Vereda	0.5	3	0.5	3
Germinated grains	0.5	3	0.5	3
(36 h)	0.5	3	0.5	3
Sublime	0.5	3	0.5	3
Germinated grains	0.5	3	0.5	3
(72 h)	0.5	3	0.5	3
Vereda	0.5	3	0.5	3
Germinated grains	0.5	3	0.5	3
(72 h)	0.5	3	0.5	3
Sublime	0.5	3	0.5	3

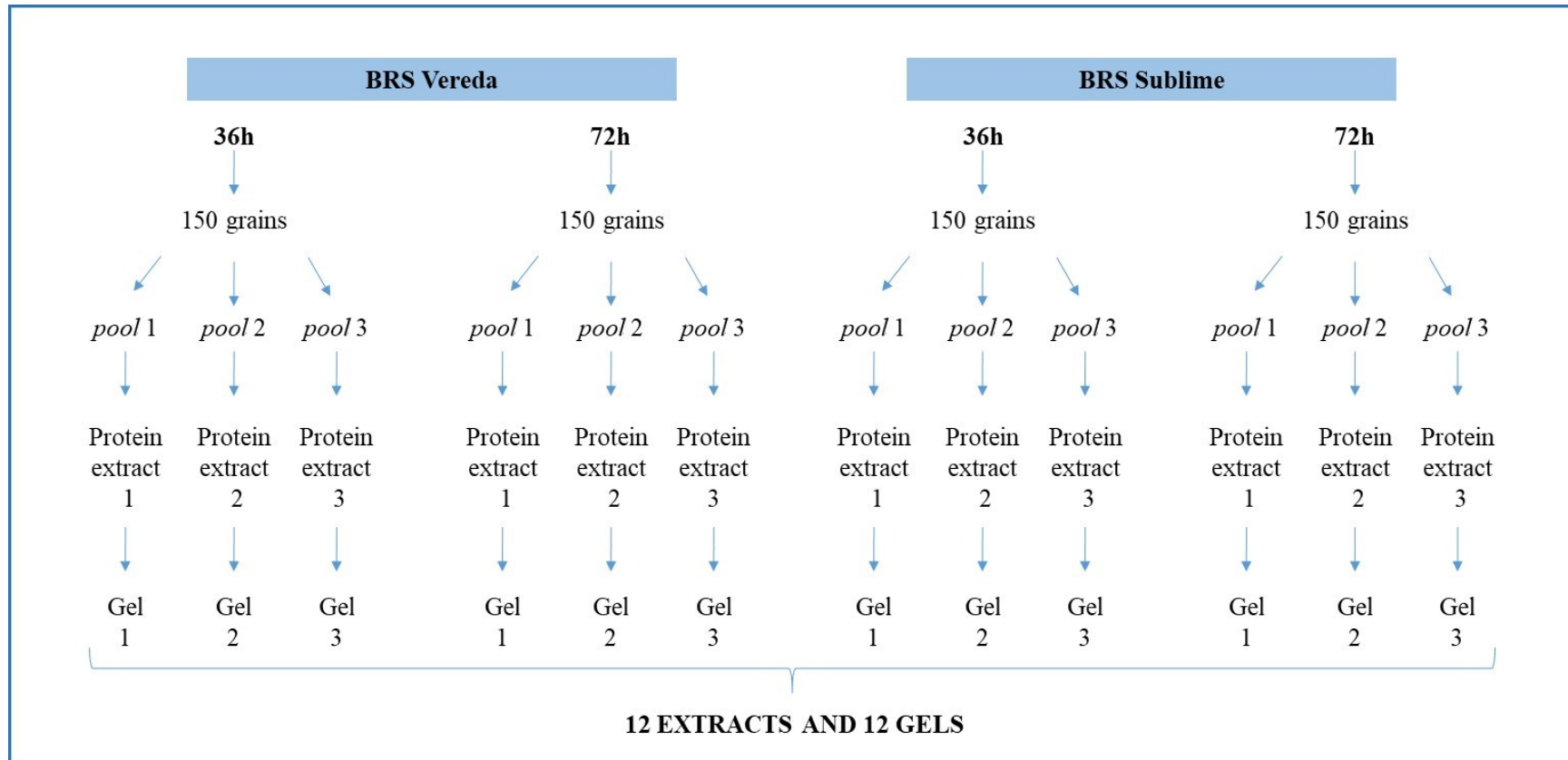


Figure S1. Experimental design of total soluble protein extraction and 2-DE for germinated grains of two common bean cultivars, 'BRS Vereda' and 'BRS Sublime'.

REFERENCES

- (1) Smýkal, P.; Coyne, J. P.; Ambrose, M. J.; Maxted, N.; Schaefer, H.; Blair, M. W.; Berger, J.; Greene, S. L.; Nelson, M. N.; Besharat, N.; Vymyslick, T.; Toker, C.; Saxena, R. K.; Roorkiwal, M.; Pandey, M. K.; Hu, J.; Ying, H. L.; Wang, X. L.; Guo, Y.; Qiu, L. J.; Redden, R. J.; Varshney, R. K. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Crit Rev Plant Sci.* **2015**, *34*, 43-104.
- (2) Luna-vital, D. A.; Mojica, L.; De Mejía, E. G.; Mendoza, S.; Loarca-piña, G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Res. Int.* **2015**, *76*, 39–50.
- (3) de Souza Rocha, T. S.; Hernandez, L. M. R.; Mojica, L.; Johnson, M. H.; Chang, Y. K.; de Mejía, E. G. Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes in vitro. *Food Res. Int.* **2015**, *76*, 150-159.
- (4) Los, F. G. B.; Zielinski, A. A. F.; Wojeicchowski, J. P.; Nogueira, A.; Demiate, I. M. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Curr Opin Food Sci.* **2018**, *19*, 63-71.
- (5) Chávez-Mendoza, C.; Sánchez, E. Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules.* **2017**, *22*, 1360.
- (6) Yang, Q. Q.; Gan, R. Y.; Ge, Y. Y.; Zangh, D.; Corke, H. Polyphenols in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, Analysis, and Factors Affecting Composition. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 1518-1539.
- (7) Mojica, L.; Luna-Vital. D. A.; De Mejía. E. G. Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2401–2410.

- (8) López-Martínez, L. X.; Leyva-López, N.; Gutiérrez-Grijalva, E. P.; Heredia, J. B. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. *J. Funct. Foods*. **2017**, *38*, 624-634.
- (9) Broughton, W. J.; Hernandez, G.; Blair, M.; Beebe, S.; Gepts, P.; Vanderleyden, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant Soil*. **2003**, *252*, 55-128.
- (10) Duenas, M. et al. Sarmiento, T.; Aguilera, Y.; Benitez, V.; Molla, E.; Esteban, R. M.; Martín-Cabreas, M. A. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *LWT-Food Sci Technol*. **2016**, *66*, 72-78.
- (11) Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J.; Menard, O.; Recio, I.; Santos, C. N.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct*. **2014**, *5*, 1113–1124.
- (12) Chen, P. X.; Dupuis, J. H.; Marcone, M. F.; Pauls, P. K.; Liu, R.; Liu, Q.; Tang, Y.; Zhang, B.; Tsao, R. Physicochemical Properties and in Vitro Digestibility of Cooked Regular and Nondarkening Cranberry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Effects on Bioaccessibility, Phenolic Composition, and Antioxidant Activity. *J Agr Food Chem*. **2015**, *63*, 10448–10458.
- (13) Guzmán-Méndez, B. et al. Jaramillo-Flores, M. E.; Chel-Guerrero, L.; Betancur-Ancona, D. Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris*. *Int J Food Sci Tech*. **2014**, *49*, 1859–1868.
- (14) Mojica, L; Chen, K; De Mejía, E. G. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. *J. Food Sci*. **2015**, *80*, H188-H198.

- (15) FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. In The statistics division of the FAO, faostat.fao.org/Access: 04/12/2019, 2019.
- (16) Rossi, G. B.; Valentim-Neto, P. A.; Blank, M.; de Faria, J. C.; Arisi, A. C. M. Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7588–7597.
- (17) Mamilla, R. K.; Mishra, V. K. Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. *LWT-Food Sci Technol.* **2017**, *75*, 51-58.
- (18) Wendland, A.; Pereira, H. S.; de Faria, L. C.; Souza, T. L. P. O.; Del Peloso, M. J.; da Costa, J. G. C.; Díaz, J. L. C.; Magaldi, M. C. S.; de Almeida, V. M.; de Carvalho, H. W. L.; de Melo, C. L. P.; da Costa, A. F.; Abreu, A. F. B.; Melo, L. C. BRS Sublime - Common bean cultivar with carioca grain, resistance to angular leaf spot and high nutritional quality. *Crop Breed Appl Biot.* **2018**, *18*, 440-445.
- (19) Mendoza-Sánchez, M.; Guevara-González, R. G.; Castaño-Tostado, E.; Mercado-Silva, E. M.; Acosta-Gallegos, J. A.; Rocha-Guzmán, N. E.; Reynoso-Camacho, R. Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. *Food Chem.* **2016**, *212*, 128-137.
- (20) Seraglio, S. K. T.; Valse, A. C.; Daguer, H.; Bergamo, G.; Azevedo, M. S.; Nehring, P.; Gonzaga, L. V.; Fett, R.; Costa, A. C. O. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys. *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 670-678.
- (21) Team, R. C., R: a language and environment for statistical computing. In R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2013.
- (22) Yang, P.; Li, X.; Wang, X.; Chen, H.; Chen, F.; Shen, S. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics.* **2007**, *7*, 3358-3368.
- (23) Limón, R. I.; Peñas, E.; Martínez-Villaluenga, C.; Frias, J. Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT-Food Sci Technol.* **2014**, *56*, 328-334.

(24) Balsamo, G. M.; Valentim-Neto, P. A.; Mello, C. S.; Arisi, A. C. M., Comparative proteomic analysis of two varieties of genetically modified (GM) Embrapa 5.1 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their non-GM counterparts. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10569-10577.

(25) Valentim-Neto, P. A.; Rossi, G. B.; Anacleto, K. B.; de Mello, C. S.; Balsamo, G. M.; Arisi, A. C. M., Leaf proteome comparison of two GM common bean varieties and their non-GM counterparts by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 927-932.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grãos de leguminosas como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) são interessantes fontes de proteínas e sua rica composição em compostos bioativos promove comprovados efeitos benéficos para a saúde humana. Além disso, estudos recentes com grãos germinados de *P. vulgaris* demonstram um aumento na capacidade antioxidante desses grãos em comparação com grãos não germinados, apesar da germinação ser um processo bem conhecido e aplicado há muitos anos para outras espécies de feijão como *Vigna radiata* L., muito consumido na forma de brotos, principalmente em países asiáticos.

Nesse estudo, foi possível avaliar o perfil proteico de grãos secos de quatro cultivares melhoradas de feijão, ainda não estudadas. Proteínas diferencialmente acumuladas entre as cultivares foram identificadas, a maioria proteínas de armazenamento como as faseolinas, que apresentam potencial para serem utilizadas no melhoramento genético de *P. vulgaris*, leguminas que possuem níveis mais elevados de aminoácidos sulfurados do que as faseolinas e lectinas que apesar de serem conhecidas por seus efeitos antinutricionais tem demonstrado efeitos benéficos em certas concentrações.

Mapas proteicos de grãos germinados de duas das quatro cultivares analisadas na primeira etapa desse estudo também foram avaliados e foi possível observar degradação de proteínas de maior massa molecular e aumento de proteínas de menor massa molecular com o aumento do tempo de germinação, nas duas cultivares. Além disso, a expressão das proteínas presentes em todos os géis bidimensionais foi mais influenciada pelos diferentes tempos de germinação do que pelas diferentes cultivares. A capacidade antioxidante em grãos germinados por 36 h foi maior nas duas cultivares, antes e após digestão *in vitro*, sugerindo que para *P. vulgaris* ocorre uma diminuição na capacidade antioxidante após esse período. Nos isolados proteicos, o mesmo não foi observado, pois o cozimento promoveu maior capacidade antioxidante antes e após digestão *in vitro* para a cultivar 'BRS Vereda', com aumento considerável após a digestão.

Este trabalho forneceu o primeiro proteoma de grãos secos das cultivares 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio' e 'BRS Estilo' e germinados das cultivares 'BRS Sublime' e 'BRS Vereda', além de resultados importantes quanto a capacidade antioxidante após o cozimento, processamento mais utilizado antes do consumo de feijão, e germinação em dois tempos, antes e após digestão *in vitro*.

Sugere-se como estudos futuros a identificação das proteínas diferencialmente expressas nos grãos entre os tempos de germinação testados nesse trabalho e dos peptídeos obtidos após

o cozimento e digestão, uma vez que os dois em conjunto promoveram maior capacidade antioxidante nos isolados proteicos, em uma das cultivares avaliadas. Também seria possível avaliar quanto a capacidade antioxidante, diferentes compostos bioativos presentes no feijão, isoladamente, diferentes processos, cultivares e tempos de germinação até 36 h.

ANEXO A – Primeira página da publicação do artigo “Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars”

Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars

Gabriela Barbosa Rossi,[‡] Pedro Alexandre Valentim-Neto,[†] Martina Blank,[‡] Josias Correa de Faria,[‡] and Ana Carolina Maisonnave Arisi^{*,†}

[†]CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department and [‡]CEBIME UFSC, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

[‡]Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brazil

 Supporting Information

ABSTRACT: Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a source of proteins for about one billion people worldwide. In Brazil, 'BRS Sublime', 'BRS Vereda', 'BRS Esteio', and 'BRS Estão' cultivars were developed by Embrapa to offer high yield to farmers and excellent quality to final consumers. In this work, grain proteomes of these common bean cultivars were compared based on two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and tandem mass spectrometry (MS/MS). Principal component analysis (PCA) was applied to compare 349 matched spots in these cultivars proteomes, and all cultivars were clearly separated in PCA plot. Thirty-two differentially accumulated proteins were identified by MS. Storage proteins such as phaseolins, legumins, and lectins were the most abundant, and novel proteins were also identified. We have built a useful platform that could be used to analyze other Brazilian cultivars and genotypes of common beans.

KEYWORDS: *Phaseolus vulgaris*, proteome, 2-DE, MS, PCA

INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a source of proteins, complex carbohydrates, vitamins, iron, and calcium for about one-billion people worldwide. It is an important staple food especially in Latin America and Africa.^{1,2} This legume presents benefits in agriculture, due to its ability to fix atmospheric nitrogen,³ as well as in human health, due to its grain composition, rich in soluble fiber, phenolic compounds, saponins, minerals, proteins, and peptides.^{4–6} Factors such as climate change result in biotic and abiotic stresses in crops including common bean, which lead to a decrease in yield and nutritional status. In this sense, proteomics linked with genomics and transcriptomics will probably improve the agronomic merit and quality traits of common bean.⁷ The complete genome of common bean has become available,⁸ and seed proteome has been investigated.^{9–14} The seed proteome profile of phaseolin has been proposed as a marker in common bean genetic improvement.¹⁰ Temporal changes during common bean seed development were recently analyzed to provide a comprehensive seed proteome atlas in an attempt to develop and select new common bean cultivars with desired seed quality traits.¹⁵

Brazil is among the world's leading producers and consumers of common beans. In 2014, the country produced 3.29 million tons of beans,¹⁶ and by 2023, it is estimated that production could increase about 14%.¹⁶ Common bean is cultivated by small and large producers in all Brazilian regions and different cropping systems.¹⁷ This diversity implies a constant search for cultivars that present desirable agronomic characteristics and consumer preferences. From 1984–2010, common bean genetic improvement program coordinated by Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) launched 50

new cultivars in Brazil.¹⁷ 'BRS Sublime', 'BRS Estão', 'BRS Esteio', and 'BRS Vereda' are Brazilian cultivars developed by Embrapa to offer high yield to farmers and excellent quality to final consumers. 'BRS Sublime' and 'BRS Estão' belong to the "carioca" grain type, which represents about 70% of the Brazilian production.¹⁸ 'BRS Esteio' is black grain type, the second grain type most consumed in Brazil, and represents 20% of total common bean production;¹⁹ 'BRS Vereda' has pink grain type, different from other commercial classes, released as an alternative for consumers.²⁰ Embrapa has also developed a genetically modified common bean resistant to Bean golden mosaic virus, the event EMB-PV051-1 (Embrapa 5.1), which was approved for commercial cultivation and consumption in Brazil.^{2,21}

In this work, we compared by principal component analysis the grain proteome profiles from four Brazilian common bean cultivars, 'BRS Sublime', 'BRS Estão', 'BRS Esteio', and 'BRS Vereda'. In addition, we were able to identify 32 differentially accumulated proteins among these cultivars.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Four common bean (*P. vulgaris* L.) cultivars ('BRS Sublime', 'BRS Estão', 'BRS Esteio', and 'BRS Vereda') were cultivated and provided by Embrapa Arroz e Feijão (Rice and Bean Unit). They were grown side by side in a greenhouse from June to August 2015 in Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás State, Brazil (GPS 16°30'23.9"S 49°16'59.7"W). Approximately 40 grains of each cultivar (10 g) were ground in liquid nitrogen using an analytical mill

Received: July 12, 2017

Revised: August 2, 2017

Accepted: August 4, 2017

Published: August 4, 2017

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo “Protein profile and antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.)”

----- Mensagem original -----

Assunto:Journal of Agricultural and Food Chemistry - Manuscript ID jf-2020-01699e

Data:13.03.2020 09:22

De:Journal of Agricultural and Food Chemistry <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Para:ana.arisi@ufsc.br, ana.arisi@pq.cnpq.br

Cópia:hofmann-office@jafc.acs.org

Responder para:support@services.acs.org

13-Mar-2020

RE: Manuscript Submission Successfully Submitted

Journal:Journal of Agricultural and Food Chemistry

Manuscript ID: jf-2020-01699e

Title: "Protein profile and antioxidant capacity of processed grains from two common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.)"

Authors: Rossi, Gabriela; Tischer Seraglio, Siluana; Costa, Ana Carolina; Toaldo, Isabela Maia; Faria, Josias; Arisi, Ana

Omics Technologies Applied to Agriculture and Food

Manuscript Status: Submitted