**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum
(*Phaseolus vulgaris*, L.) e seus efeitos na digestibilidade protéica**

Karina Huber

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2012**

Karina Huber
Nutricionista

Orientadora:

Profa. Dra. **SOLANGE GUIDOLIN CANNIATTI - |**
BRAZACA

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Huber, Karina

Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e seus efeitos na digestibilidade protéica / Karina Huber. - - Piracicaba, 2011.

107 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Digestibilidade 2. Feijão 3. Polifenol 4. Proteínas 5. Tratamento térmico I. Título

CDD 635.652
H877e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Evanilde e Hans, dedico mais esta conquista com meu profundo
agradecimento, gratidão e amor.

Aos meus irmãos, Bianca, Diego e Pablo, pelos conselhos, apoio e presença constante.

Ao Tiago, por estar ao meu lado todos os dias me dando força, amor e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar mais esta vitória, me concedendo saúde, coragem, paciência e esforço em todos os momentos.

Aos meus pais, Evanilde Adame Huber e Hans Huber Saravia, exemplos de dedicação e amor aos filhos e por sempre terem feito tudo o que estava ao alcance para que meus sonhos pudessem ser concretizados. Saibam que todas as minhas conquistas serão dedicadas a vocês. O meu muito obrigada mais uma vez. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Bianca Victória Huber, Diego Germán Huber Álvarez e Pablo Nicolás Huber Álvarez, pelo apoio e incentivo ao meu ingresso na Pós-graduação e também pelos conselhos nos momentos de dúvidas, sempre acreditando na minha capacidade.

Ao meu companheiro, Tiago de Oliveira Godinho, por estar sempre ao meu lado me encorajando, aceitando minha ausência e me ajudando nas análises, mostrando seu carinho e amor.

À toda minha família, que acompanha todas as minhas conquistas. É muito bom poder contar com vocês.

À professora Dr^a Solange Guidolin Caniatti-Brazaca pelos ensinamentos, dedicação e apoio no decorrer de toda a pesquisa.

Ao professor Dr José Humberto de Queiroz pela amizade, incentivo ao meu ingresso na pesquisa e seu eterno espírito de colaboração.

À professora Dr^a Miriam Coelho de Souza por participar da banca examinadora e contribuir com seus conhecimentos nas correções e sugestões.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela contribuição em minha formação científica.

Ao secretário da Pós-graduação, Fábio, por ter me ajudado desde o meu ingresso no Programa de Pós-graduação, com sua presteza e colaboração.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelo convívio, colaboração e pelos momentos de descontração. Em especial à Eloá, que foi a minha “equipe de laboratório”, pela contribuição e dedicação na execução do trabalho.

Aos amigos de sempre Renata, Bernardo, Vitor, Stéfano, Ariane, Luciana, Érica e tantos outros, que mesmo longe sempre estiveram perto de coração, me apoiando, incentivando, compartilhando tristezas e alegrias e desejando força e sucesso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço também a todos os que eu não mencionei mas que estiveram presentes por meio de sentimentos, palavras ou atitudes durante toda a minha caminhada e na realização deste trabalho.

EPIGRAFE

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
Referências	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Feijão	21
2.2 Cultivar BRS9435 Cometa	23
2.3 Cultivar Xamego	24
2.4 Proteínas	25
2.5 Compostos Fenólicos.....	26
2.6 Atividade Antioxidante.....	32
2.7 Digestibilidade de proteínas	33
Referências	35
3 EFEITO DA COCÇÃO NO TEOR DE POLIFENÓIS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FEIJÕES DE DIFERENTES CORES	45
Resumo	45
Abstract.....	45
3.1 Introdução	45
3.2 Materiais e métodos.....	47
3.2.1 Cultivares de feijões e preparo das amostras.....	47
3.2.2 Quantificação de Taninos condensados.....	47
3.2.3 Fenólicos Totais.....	48
3.2.4 Determinação da capacidade antioxidante dos grãos de feijão	48
3.2.4.1 Método DPPH	48
3.2.4.2 Método ABTS	48
3.2.5 Análise estatística	49
3.3 Resultados e discussão	49
3.3.1 Quantificação de taninos condensados	49
3.3.2 Teor de Fenólicos totais.....	50
3.3.3 Atividade antioxidante.....	52
3.4 Conclusão	55
Referências	55

4 ALTERAÇÕES NO PERFIL ELETROFORÉTICO E NA DIGESTIBILIDADE PROTÉICA DECORRENTES DA COMPLEXAÇÃO ENTRE FASEOLINA E POLIFENÓIS DE FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.)	59
Resumo	59
Abstract.....	59
4.1 Introdução.....	60
4.2 Materiais e métodos.....	61
4.2.1 Cultivares de feijões e preparo das amostras.....	61
4.2.2 Extração de polifenóis	62
4.2.3 Fracionamento do extrato bruto de polifenóis.....	62
4.2.4 Extração da faseolina.....	63
4.2.5 Eletroforese SDS-PAGE	64
4.2.6 Digestibilidade protéica.....	65
4.2.7 Análise estatística	65
4.3 Resultados e discussão	65
4.3.1 Rendimento das extrações de polifenóis e faseolinas.....	65
4.3.2 Rendimento das frações de polifenóis	66
4.3.3 Eletroforese.....	68
4.3.4 Digestibilidade protéica.....	72
4.4 Conclusão	74
Referências	75
5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES DE FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.)	79
Resumo	79
Abstract.....	79
5.1 Introdução.....	80
5.2 Materiais e métodos.....	81
5.2.1 Cultivares de feijões e preparo das amostras.....	81
5.2.2 Extração de polifenóis	81
5.2.3 Fracionamento do extrato bruto de polifenóis.....	82
5.2.4 Determinação da atividade antioxidante.....	83
5.2.4.1 Método DPPH	83
5.2.4.2 Método ABTS	83

5.2.5 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos	84
5.2.6 Identificação e quantificação de flavonóides.....	84
5.2.7 Análise estatística	85
5.3 Resultados e discussão	85
5.3.1 Atividade antioxidante pelo método do DPPH	85
5.3.2 Atividade antioxidante pelo método do ABTS	87
5.3.3 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos	89
5.3.4 Identificação e quantificação de flavonóides.....	95
5.4 Conclusão	103
Referências	104
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	107

RESUMO

Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e seus efeitos na digestibilidade protéica

O feijão constitui-se em um dos alimentos básicos da população brasileira e proporciona vários benefícios à saúde. No entanto, possui fatores antinutricionais que impedem parte do aproveitamento de alguns de seus nutrientes, destacando-se dentre esses fatores os polifenóis. Estes podem complexar com proteínas, diminuindo a sua digestibilidade e seu aproveitamento pelo organismo. Assim, esta pesquisa teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e, após a complexação de suas proteínas e polifenóis, avaliar os efeitos dos tratamentos dados e dessa ligação na digestibilidade protéica. Foi utilizado duas cultivares de feijão comum de duas diferentes cores, preto (Xamego) e marrom (BRS9435-Cometa), e uma linhagem de coloração branca (G2358). Os grãos foram analisados na forma crua e cozidos em autoclave, macerados ou não. Foram realizadas análises de: teor de taninos, fenólicos totais, atividade antioxidante, eletroforese, digestibilidade protéica *in vitro*, e ácidos fenólicos e flavonóides por CLAE. Nas análises dos grãos íntegros, a cultivar BRS9435-Cometa crua apresentou a maior atividade antioxidante e, apesar da maceração e da cocção terem reduzido teor de taninos, compostos fenólicos e atividade antioxidante da maior parte dos feijões, a maceração aumentou significativamente a quantidade de fenólicos totais em feijão preto. Houve alteração no perfil eletroforético da proteína dos grãos após a complexação com os polifenóis. As bandas com maior peso molecular, presentes nas faseolinas puras, apresentaram menor intensidade quando houve a complexação com polifenóis. A digestibilidade das faseolinas de feijões crus variou de 95,67 a 97,66% e a de feijões cozidos de 90,44 a 97,02%. Na digestibilidade de faseolinas puras a maceração seguida de cocção somente exerceu influência significativa em grãos brancos, reduzindo a digestibilidade da faseolina. De modo geral a complexação faseolina-polifenóis aumentou o percentual de digestibilidade. O efeito esperado da complexação faseolina-frações de polifenóis em reduzir a digestibilidade da faseolina foi muito discreto e muitas vezes inexistente, e o de aumento da digestibilidade pela cocção com ou sem maceração também foi limitado. Para os extratos brutos dos feijões, os resultados de DPPH variaram de 2,96 a 14,04 mg de TEAC.g⁻¹ de extrato, e os de ABTS entre 13,70 e 29,51 mg de TEAC.g⁻¹ de extrato. Em ambos os métodos de avaliação da atividade antioxidante, os resultados foram maiores para a maioria dos extratos das cultivares marrom e preta. Quanto às análises realizadas por CLAE, para ácidos fenólicos constatou-se que todos os extratos avaliados possuem os ácidos gálico, clorogênico, vanílico e sinápico, e que os dois primeiros foram os encontrados em maiores teores; praticamente todos os flavonóides foram detectados em quase todas as amostras, com exceção do Caempferol, que somente foi detectado nas amostras maceradas e cozidas. Para extratos de feijões brancos, os flavonóides encontrados em maiores concentrações foram a catequina e o caempferol-3-rutinosídeo; extratos de feijões marrons apresentaram predominantemente a catequina e o caempferol-3-glicosídeo; e em extratos de feijões pretos, predominantemente a catequina, caempferol-3-glicosídeo e quercetina-3-glicosídeo. De maneira geral, o efeito do tratamento térmico aumentou a atividade antioxidante, bem como a concentração dos compostos fenólicos avaliados nos extratos de feijões.

Palavras-chave: Tratamento térmico; Faseolina; Polifenóis; Digestibilidade

ABSTRACT

Evidence of proteins-tannins interaction in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on protein digestibility

Common bean is one of the staples of the Brazilian population and provides numerous health benefits. Nevertheless, it has antinutritional factors that prevent the use of some part of their nutrients, especially polyphenols. These can complex with proteins, decreasing their digestibility and utilization by the body. Thus, this research aimed to evaluate the antioxidant potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and, after complexation of proteins and polyphenols, assess the effects of treatments given and of this complexation on protein digestibility. Was used two common bean cultivars in two different colors, black (Xamego) and brown (BRS9435-Comet), and a line of white color (G2358). The grains were analyzed as raw and cooked in an autoclave, soaked or not. The analyses that were performed are: content of tannins, total phenolics, antioxidant activity, electrophoresis, *in vitro* protein digestibility, and phenolic acids and flavonoids by HPLC. In the analyses of whole grains, raw BRS9435-Comet had the highest antioxidant activity and, despite soaking and cooking have shown low levels of tannins, phenolic compounds and antioxidant activity of most beans, soaking significantly increased the amount of total phenolic in black beans. There were changes in the electrophoretic profile of protein from grains by complexation with polyphenols. The bands with higher molecular weight, present in pure phaseolins, had a lower intensity when there was complexation with polyphenols. The digestibility of phaseolins from raw beans ranged from 95.67 to 97.66% and from cooked beans from 90.44 to 97.02%. Digestibility of pure phaseolins from soaked beans only exerted significant influence on white grains, reducing the digestibility of phaseolin. In general, the complexation of phaseolin and polyphenols increased percentage of digestibility. The expected effect of complexation of fractions of polyphenols and phaseolins in reduce the digestibility of phaseolins was very low and often non-existent, and the increase in the digestibility by cooking with or without soaking was also limited. For crude extracts of the beans, the results of DPPH ranged from 2.96 to 14.04 mg TEAC.g⁻¹ extract, and of ABTS between 13.70 and 29.51 mg TEAC.g⁻¹ extract. In both methods of assessing antioxidant activity, the results were higher for most of the extracts of brown and black cultivars. For analyses performed by HPLC it was found for phenolic acids that all extracts evaluated have the gallic acid, chlorogenic, vanillic and sinapic, and the first two were found at higher levels. Practically all flavonoids were detected in almost all samples, except for kaempferol, which was only detected in soaked and cooked samples. For extracts from white beans, flavonoids found in highest concentrations were catechin and kaempferol-3-rutinoside; brown beans extracts showed mostly catechin and kaempferol-3-glucoside, and in extracts of black beans, mainly catechin, kaempferol-3-glucoside and quercetin-3-glucoside. In general, the effect of heat treatment increased the antioxidant activity and concentration of phenolic compounds evaluated in extracts of beans.

Keywords: Heat treatment; Phaseolin; Polyphenols; Digestibility

1 INTRODUÇÃO

Os feijões estão entre os alimentos mais antigos, remontando aos primeiros registros da história da humanidade. Eram cultivados no antigo Egito e na Grécia, sendo, também, cultuados como símbolo da vida (EMBRAPA, 2005a). Atualmente são cultivados em todos os continentes (CARNEIRO et al., 2005). O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus* (EMBRAPA, 2005a).

O feijão comum é um alimento rico sob o aspecto nutricional pelo fato de possuir cerca de 20 a 30% de proteínas (YIN et al., 2010; GENOVESE; LAJOLO, 2001), 65% de carboidratos (RIBEIRO et al., 2009), vitaminas do complexo B e minerais (Ca, Fe, Cu, Zn, P, K e Mg) (ARMELIN et al., 2007), sendo bom substituinte de alimentos que contém proteína de origem animal. O perfil de aminoácidos das proteínas de feijão comum é caracterizado pela deficiência em aminoácidos sulfurados e triptofano (YIN et al., 2010), sendo a metionina o aminoácido limitante, ao passo que a lisina é o aminoácido que se encontra em maior proporção (MOURA; CANNIATTI-BRAZACA, 2006).

Sabe-se que a digestibilidade do feijão cru situa-se entre 25 e 60%. Polifenóis, fitatos, inibidores enzimáticos, fitohemaglutininas e fatores de flatulência e cianogênicos são algumas das substâncias antinutricionais e tóxicas presentes no feijão (MONTROYA et al., 2010; CHIARADIA et al., 1999). O tratamento térmico é realizado com a finalidade de cozinhar os grãos, mas também reduz o efeito dessas substâncias (MAMONE et al., 2009), podendo aumentar a digestibilidade protéica para 65 a 85%, dependendo da variedade do feijão e do processo de cozimento usado, além de proporcionar as propriedades sensoriais de sabor e textura exigidos pelo consumidor (DONADEL; PRUDENCIO-FERREIRA, 1999).

A digestibilidade das proteínas decresce com o aumento da pigmentação do tegumento da semente, sendo os compostos fenólicos os responsáveis por essa pigmentação da casca (EMBRAPA, 2005b). Esse decréscimo na digestibilidade protéica ocorre pelo fato destes polifenóis poderem interagir com as proteínas do feijão ou inibirem enzimas digestivas (MOURA et al., 2005; GENOVESE; LAJOLO, 2001). Como consequência, o valor nutricional é diminuído e a estrutura tridimensional das proteínas é modificada, alterando suas propriedades funcionais. As interações covalentes entre polifenóis e proteínas, juntamente com uma série de transformações enzimáticas, contribuem para o fenômeno de escurecimento. Estas interações são irreversíveis e, caso aminoácidos essenciais estejam

envolvidos nas ligações com polifenóis, haverá decréscimo do valor nutricional do alimento, além de alterações nas qualidades organolépticas (CHIARADIA et al., 1999).

Estudos envolvendo fracionamento das proteínas de *Phaseolus vulgaris* L., têm demonstrado que se trata de uma mistura de quatro frações de proteínas: globulinas, das quais a faseolina é a mais abundante (PINO; LAJOLO, 2003), albuminas, glutelinas e prolaminas (BONETT et al., 2007).

Os polifenóis se encontram nas plantas como metabólitos secundários, raramente ativos, e são vastamente conhecidos devido a sua capacidade antioxidante, assumindo, portanto, papel relevante na diminuição do risco de doenças cardiovasculares, diabetes, alguns tipos de câncer, Mal de Alzheimer e Parkinson (LUJÁN et al., 2008; MOURA et al., 2005). Entre os compostos fenólicos presentes no feijão, destacam-se os taninos, que podem ser classificados como hidrolisáveis ou condensados. Essa última classe é encontrada geralmente em plantas dicotiledôneas e em produtos alimentares; enquanto os hidrolisáveis são encontrados somente em quantidades traço. Ambos os tipos de taninos dietéticos exibem a habilidade em complexar e precipitar proteínas, além de serem termoestáveis; sendo, portanto, motivo de preocupação (DELFINO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; RÁMIREZ CÁRDENAS, 2006).

Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar os efeitos da complexação proteínas-polifenóis de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e dos processos de cocção e maceração na digestibilidade protéica, bem como no potencial antioxidante dos polifenóis presentes no mesmo.

Referências

- ARMELIN, J.M.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; PIEDADE, S.M. de S.; MACHADO, F.M.V.F.; SPOTO, M.H.F. Avaliação física de feijão carioca irradiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 498-502, set. 2007.
- BONETT, L.P.; BAUMGARTNER, M.S.T.; KLEIN, A.C.; SILVA, L.I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 235-246, set. 2007.
- CARNEIRO, J.C.S.; MINIM, V.P.R.; SOUZA, M.M.; CARNEIRO, J.E.S.; ARAÚJO, G.A.A. Perfil sensorial e aceitabilidade de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 18-24, mar. 2005.
- CHIARADIA, A.C.N.; COSTA, N.M.B.; GOMES, J.C. Retirada do tegumento e da extração dos pigmentos na qualidade protéica de feijão-preto. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 131-136, ago. 1999.

DELFINO, R.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade protéica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 308-312, jun. 2010.

DONADEL, M.E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 380-386, set. 1999.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2005a. Disponível em:<<http://www.cnpaf.embrapa.br/>> Acesso em: 15 ago. 2010.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2005b. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_2_28102004161635.html> Acesso em: 9 ago. 2010.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Atividade inibitória de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): avaliação crítica dos métodos de determinação. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 51, n. 4, p. 386-394, 2001.

LUJÁN, D.L.B.; LEONEL, A.J.; BASSINELLO, P.K.; COSTA, N.M.B. Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade protéica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 142-149, dez. 2008.

MAMONE, G.; PICARIELLO, G.; CAIRA, S.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Analysis of Food Proteins and Peptides by Mass Spectrometry-Based Techniques. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 1216, p. 7130-7142, 2009.

MONTOYA, C.A.; LALLÈS, J.P.; BEEBE, S.; LETERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 443-449, 2010.

MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SPOTO, M.H.F.; ARTHUR, V. Avaliação sensorial de feijão preto submetido à radiação de Cobalto-60. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 370-374, jun. 2005.

MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 270-276, jun. 2006.

PINO, V.H.D.; LAJOLO, F.M.; Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.), sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n.1, p. 49-53, abr. 2003.

RÁMIREZ CÁRDENAS, L.L.A. **Valor nutricional, biodisponibilidade de ferro e zinco e efeitos funcionais de diferentes variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas a tratamentos domésticos: estudo em ratos.** 2006.189p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

RIBEIRO, H.J.S.S.; PRUDENCIO, S.H.; MIYAGUI, D.T.; RIBEIRO, E.L.A. Caracterização de concentrado protéico de feijão comum preto, cultivar Iapar 44, novo e envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 571-580, set. 2009.

YIN, S.W.; TANG, C.H.; WEN, Q.B.; YANG, X.Q.; YUAN, D.B. The relationships between physicochemical properties and conformational features of succinylated and acetylated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 730-738, 2010.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Feijão

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é mundialmente a leguminosa de maior consumo humano, principalmente nos países em desenvolvimento (TAYLOR et al., 2008). A produção mundial de feijão representa um terço da produção total de grãos (19,3 milhões de toneladas/ano), sendo duas vezes superior à produção de grão-de-bico, que é a segunda leguminosa mais importante em termos de produtividade. Trata-se de um grão extremamente diverso quanto aos métodos de cultivo, utilização, variedade de ambientes nos quais se adapta e quanto à variedade morfológica. São encontrados desde o nível do mar até 3.000 m de altitude, cultivados como monocultura, em associações ou em sistema de rotação de culturas (BROUGHTON et al., 2003). É produzido principalmente na América Latina e África central, locais onde este alimento é considerado básico para grande parte da população (MONTROYA et al., 2010).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2010), o Brasil é o segundo produtor mundial de feijão do gênero *Phaseolus* e o primeiro na espécie *Phaseolus vulgaris*, tendo produzido 3.522,979 toneladas na safra de 2009. A importância dessa produção se deve ao fato de que o feijão, além de se constituir um dos alimentos básicos da população brasileira (o consumo passou de 2.880,0 mil toneladas na safra 2000/01 para 3.400,0 mil toneladas na safra 2007/08), é um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais economicamente menos favorecidos (CONAB, 2008). No Brasil, o consumo per capita de feijão é de cerca de 16 kg/ano (EMBRAPA, 2005a), e as duas regiões que mais consomem são o nordeste (consumo per capita de 20,8 Kg/ano) e sudeste (consumo per capita de 18,2 Kg/ano), regiões menos e mais desenvolvidas, respectivamente (LOPES JÚNIOR, 2008).

Destaca-se por sua vasta variabilidade; sendo seus tamanhos e colorações as características qualitativas mais importantes para os consumidores (SKOWRONSKI et al., 2003). O consumo dessa leguminosa tem sido relacionado à redução do risco de doenças crônicas, pois estudos com animais vem demonstrando que o consumo regular de feijões contribui para o decréscimo da incidência de câncer de cólon (CAMPOS-VEGA et al., 2009). Feijões comuns são boas fontes de proteínas, além de serem importante fonte de carboidratos complexos, minerais, vitaminas do complexo B e fibra alimentar, componentes estes importantes para a promoção de uma dieta saudável (SILVA et al., 2009; RIOS et al., 2003).

As proteínas mais encontradas em feijões são globulina e albumina, sendo a segunda caracterizada por sua solubilidade em soluções aquosas (PARK et al., 2010). Das globulinas, destaque deve ser dado às faseolinas, que perfazem de 40 a 50% do total de proteínas (MONTROYA et al., 2008). Há, ainda nessa leguminosa, prolaminas e glutelinas, porém em pequenas quantidades (1,7% e 22,4%, respectivamente, do total de proteínas desses grãos) (BONETT et al., 2007). Embora o teor de proteínas em feijões seja alto (cerca de 25%), a presença de fatores antinutricionais, tais como os inibidores de α -amilase e de tripsina, naturalmente existentes nesses grãos, reduz consideravelmente a digestibilidade dessas proteínas (GENOVESE; LAJOLO, 2001; LAJOLO; GENOVESE, 2002). Para reduzir em partes essa problemática, é necessário a realização da cocção desses grãos; que promove aumento da digestibilidade protéica de 20,8% para 69,33 a 82,59% (TOLEDO; CANNIATTI-BRAZACA, 2008).

Leguminosas possuem quantidades de minerais muito superiores às de cereais. Ademais, os primeiros são consumidos geralmente na forma íntegra, o que assegura que haverá o consumo da casca, na qual se encontra a maior parte desses nutrientes (BROUGHTON et al., 2003). Os principais encontrados em feijões são o cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, fósforo e zinco. Entretanto, outros componentes presentes nesses grãos, como fitatos e fibras, podem afetar negativamente a biodisponibilidade desses minerais (SEBASTIÁ et al., 2001).

Feijões comuns crus são boa fonte de vitaminas hidrossolúveis, especialmente a tiamina ou vitamina B₁ (0,86 a 1,14 mg.100g⁻¹), riboflavina ou vitamina B₂ (0,136 a 0,266 mg.100g⁻¹), niacina (1,16 a 2,68 mg.100g⁻¹), vitamina B₆ (0,336 a 0,636 mg.100g⁻¹) e ácido fólico (0,171 a 0,579 mg.100g⁻¹), mas são escassos em vitaminas lipossolúveis e vitamina C (PIRES, 2002).

Carboidratos representam o maior componente da composição centesimal do feijão (55 a 65%). Destes, há amido (22 a 45%), fibra alimentar solúvel e insolúvel, pectina, gomas, hemicelulose, inulina, oligossacarídeos (rafinose, estaquiose e verbascose), entre outros. Os oligossacarídeos não são digeridos pelas enzimas gastrointestinais e, portanto, estimulam o crescimento e atividade de algumas bactérias do cólon capazes de produzir ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) (HERNANDEZ-SALAZAR et al., 2010), os quais estimulam a absorção de água e de minerais, e desencadeiam flatulência e efeitos prebióticos (FIALHO et al., 2006). O amido de feijão tem digestão mais lenta quando

comparado ao de cereais e promove mudanças menos abruptas na glicose sanguínea e, consequentemente, nos teores de insulina (MARTÍN-CABREJAS et al., 2009).

A fibra alimentar consiste principalmente das frações solúvel e insolúvel e possui efeitos benéficos à saúde, incluindo o efeito laxativo, atenuação do colesterol e glicose sanguíneos e aumento da perda fecal de ácido biliar (CAMPOS-VEGA et al., 2009). No entanto, a capacidade da fibra se ligar a íons de minerais polivalentes pode desencadear redução na biodisponibilidade de certos nutrientes, principalmente minerais e proteínas (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008).

O feijão, assim como outras leguminosas, contém vasto teor de compostos bioativos, tais como: inibidores enzimáticos, lectina, fitato, oligossacarídeos e polifenóis (principalmente taninos). Esses compostos desempenham efeitos positivos, negativos ou ambos, e assim, alguns deles são considerados fatores antinutricionais ou assumem efeitos preventivos a algumas doenças (DÍAZ-BATALLA et al., 2006). Agem como fatores antinutricionais ao reduzirem a utilização de proteínas, carboidratos e minerais pelo organismo (LAJOLO; GENOVESE, 2002). Os bioativos benéficos tais como os polifenóis estão relacionados à redução do risco de surgimento de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer e outras pelo fato de possuírem propriedades anticarcinogênicas e antioxidantes (PERAZZINI et al., 2008).

Para melhorar a qualidade nutricional do feijão, o descascamento, a maceração, o cozimento e a germinação são métodos utilizados, e seus efeitos variam dependendo da cultivar e do tratamento. Dentre eles, destacam-se a cocção, que por si só reduz significativamente grande parte dos compostos antinutricionais presentes no feijão (HELBIG et al., 2003), e a maceração, que reduz o tempo necessário para o cozimento pelo fato de promover hidratação dos grãos entre 92 e 107% (MKANDA et al., 2007). Sementes previamente maceradas iniciam a cocção hidratadas e com polissacarídeos pécicos de menor peso molecular e mais flexíveis, visto que foram enzimaticamente modificados durante a maceração. Assim, quando feijões macerados são cozidos, a solubilização das pectinas (responsáveis pela separação celular) requer menos energia térmica, reduzindo dessa forma o tempo de cozimento (MARTÍNEZ-MANRIQUE et al., 2011).

2.2 Cultivar BRS9435 Cometa

Pertencente ao grupo carioca, a cultivar BRS9435-Cometa apresenta produtividade de 3.241 Kg.ha⁻¹, teor de proteína de 24,7%, tempo de cozimento médio de 23 minutos

(classificado como de resistência normal à cocção) e relação de hidratação de 2,05, o que significa que esses grãos absorvem massa de água aproximadamente igual à sua massa inicial (GUARNIERI et al., 2009).

Trata-se de uma cultivar de porte ereto, o que facilita os tratamentos culturais e a colheita mecânica, além de reduzir as perdas na colheita se esta coincidir com período prolongado de chuvas. Apresenta boa resistência e possui ciclo de 80 dias a partir da emergência à colheita, sendo uma boa opção para os agricultores que queiram cultivares com ciclo precoce (ABREU et al., 2011). É resistente ao vírus do mosaico comum, aos patótipos 55, 95 e 453 de *Colletotrichum lindemutianum*, à mancha-angular, à ferrugem e à antracnose (DE FARIA et al., 2008; EMBRAPA, 2011).

No tocante aos seus componentes de produção, a BRS9435-Cometa apresenta valores médios de vagens por planta igual a 10,2; grãos por planta de 47,6; grãos por vagem de 4,6; e massa para cada 100 grãos igual a 24,73 g (PORTUGAL et al., 2009). Necessita de mais de 50% de radiação solar para obter bom desenvolvimento da parte aérea (vigor de ramos e folhas) e conseqüentemente maior produção de matéria seca, porém necessita de menor teor de radiação solar para apresentar maior altura da planta até a quinta semana de seu ciclo de crescimento (GOULART et al., 2010).

2.3 Cultivar Xamego

A cultivar Xamego pertence ao grupo comercial preto, possui porte ereto, grãos pequenos e foscos, floração média de 42 dias, ciclo de 86 dias, massa de 100 grãos de 17,3 g, grãos por planta igual a 27 e produtividade média de 1.674 Kg/ha. É resistente à antracnose, à ferrugem e ao mosaico-comum e moderadamente resistente à murcha de *Fusarium* em condições de campo (EMBRAPA, 2011b; FONSECA et al., 2007; FAGERIA et al., 2001). É suscetível à mancha-angular, crestamento bacteriano comum e mosaico dourado (SCHMILDT et al., 2010). Apresenta bom desempenho em áreas com baixa fertilidade durante o inverno, sob irrigação (CARVALHO; WANDERLEY, 2007).

O feijão comum, cultivar Xamego, é recomendado para plantio nos estados de Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro e no Distrito Federal. Apresenta redução em sua produtividade com o aumento dos níveis de desfolha em todos os estádios de desenvolvimento, com exceção do estádio de vagens secas, e seu número de vagens por planta (igual a 11,9) é o componente de rendimento mais correlacionado com sua produtividade (SCHMILDT et al., 2010).

2.4 Proteínas

Sementes de leguminosas apresentam alto conteúdo protéico, sendo que a porcentagem de proteínas em feijão varia de 20 a 30% de acordo com os tipos existentes (YIN et al., 2009). Há evidências de que fatores ambientais, como localização geográfica, diferenças nas safras e anos agrícolas e diferenças nas condições edafoclimáticas, podem influenciar significativamente o conteúdo de proteínas. Este teor é correlacionado negativamente com características agronômicas (número de vagens por planta, número de sementes por vagem e rendimento de grãos por planta), evidenciando a dificuldade em efetuar a seleção de cultivares com elevados teores de proteínas e alto potencial de rendimento (BURATTO et al., 2009).

As proteínas de reserva de feijões, tais quais em outras leguminosas representam cerca de 80% das proteínas totais das sementes e localizam-se em corpúsculos protéicos no cotilédone (DURANTI; GIUS, 1997). Nesse grão, praticamente não há prolaminas (2 a 4%), predomina as globulinas (40 a 60%) e depois as albuminas (20%) e glutelinas (20 a 30%), (NEVES et al., 2006; MONTOYA et al., 2010; FREITAS et al., 200).

Em geral, proteínas de reserva são globulinas, enquanto as albuminas desempenham papéis metabólicos essenciais como participação na constituição de enzimas (lipoxigenase e lectinas, por exemplo), além de conter aminoácidos sulfurados importantes para a nutrição, apresentando, dessa forma, maior valor biológico do que as globulinas (PARK et al., 2010). O grupo das globulinas é formado pelas faseolinas (ou vicilinas) e leguminas, de acordo com a sua precipitação (SILVA et al., 2001). As proteínas restantes, glutelinas e prolaminas, estão fortemente ligadas às organelas e membranas celulares e são pouco estudadas (PIRES, 2002).

As proteínas do feijão, como um todo, apresentam digestibilidade aparente inferior às de cereais, e mesmo às de algumas leguminosas, o que reduz seu valor nutricional. Este é, também, diminuído pela quantidade limitante dos aminoácidos sulfurados como a metionina, e pela biodisponibilidade desses aminoácidos que, também é considerada baixa (LOPES JÚNIOR, 2008). O valor nutritivo das proteínas de feijão, no entanto, é aumentado pelo processamento térmico, especialmente pelo calor úmido. Isso decorre, provavelmente, da desnaturação das proteínas e dos fatores antinutricionais de natureza protéica, visto que estes precisam estar íntegros para exercer os seus efeitos biológicos e que as proteínas desnaturadas permitem maior acesso ao ataque enzimático (DA SILVA et al., 2006). Exceção ao exposto são as albuminas, que possuem digestibilidade *in vitro* baixa (26 a 32%) que,

independentemente da variedade, após cocção é reduzida ainda mais (13 a 18%) (GENOVESE; LAJOLO, 1998).

A globulina de reserva de maior concentração no feijão é a faseolina ou fração 7S (40 e 50% da proteína total), contra 10% da fração 11S das globulinas (DERBYSHIRE et al., 1976). Sua composição aminoacídica é caracterizada pelo baixo conteúdo de cisteína, metionina e triptofano, e alto conteúdo dos aminoácidos aromáticos leucina, lisina, ácido glutâmico e ácido aspártico. É caracterizada, ainda, pela alta resistência à hidrólise enzimática. No entanto, sabe-se que o tratamento térmico aumenta drasticamente a hidrólise dessa proteína ao provocar mudanças em suas estruturas terciárias e quaternária (MONTROYA et al., 2010).

Muitas variações genéticas da faseolina tem sido reportadas com diferenças de quantidade e peso molecular de suas subunidades. Passam de 40 os tipos de faseolina que tem sido classificadas por eletroforese de acordo com a composição das suas subunidades. Os três subtipos de faseolina mais estudados são o S, T e I, sendo o S e o T os mais encontrados. Eles possuem tipicamente três subunidades com peso molecular variando de 45,6 a 54,4 kDa (MONTROYA et al., 2008b). A faseolina S, de sementes pequenas, é encontrada principalmente nas cultivares da América Central (do México ao norte da Colômbia), enquanto que a faseolina T, de grãos grandes e volumosos, é encontrada predominantemente nas cultivares dos Andes (incluindo o sul do Peru, Bolívia, Argentina e Chile). Essa diversidade molecular tem sido utilizada como um indicador evolutivo da domesticação e dispersão de feijões (SHARMA et al., 2006).

2.5 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e estão geralmente envolvidos nos sistemas de defesa destas à radiação ultravioleta e à agressão por patógenos (ISLAM et al., 2003). Esses compostos podem ser classificados em diferentes grupos de acordo com a sua função, número de anéis fenólicos que eles contém e aos elementos que ligam esses anéis uns aos outros (ROBBINS; BEAN, 2004).

Em adição ao valor nutritivo de feijões, significativa quantidade de compostos fenólicos é encontrada no tegumento, tais como os ácidos fenólicos, flavonóides e antocianidinas (delfinidina, cianidina, pelargonidina, malvidina e petunidina) (MADHURJITH; SHAHIDI, 2005), substâncias estas que desempenham atividades anticarcinogênicas, antimutagênicas e antioxidantes (APARICIO-FERNANDEZ et al., 2005). Estas atividades

são importantes na inibição de mecanismos oxidativos que podem levar ao surgimento de doenças degenerativas (FEREGRINO-PÉREZ et al., 2008; MACHADO et al., 2008).

Fatores ambientais, tais como o local de crescimento, bem como fatores genéticos (cultivares) influenciam no nível de compostos bioativos (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007). Os compostos fenólicos mais comumente encontrados em feijão comum cru e cozidos são os ácidos gálico, vanílico, p-cumárico, ferúlico, sinápico e clorogênico, e os flavonóides catequina, caempferol, quercetina, miricetina e procianidinas (XU; CHANG, 2009; AMAROWICZ et al., 2008). Em feijões pretos crus, os ácidos fenólicos correspondem a aproximadamente $647,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ de feijão e os flavonóides a aproximadamente $677,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ de feijão. Após o cozimento dos grãos, esses teores são reduzidos em 17,9 a 44,5% para ácidos fenólicos e em 12 a 65% para flavonóides (DÍAZ-BATALLA et al., 2006).

Os taninos são flavonóides poliméricos (DÍAZ et al., 2010). Pertencem à subclasse flavanol dos flavonóides e possuem peso molecular maior que 500. São normalmente divididos em dois grupos: taninos condensados (ou proantocianidinas) e taninos hidrolisáveis. Os condensados são oligômeros ou polímeros de procianidina e ou prodelfinidina, ligados pelos carbonos C4-C8 ou C4-C6 (Figura 1) (ISANGA; ZHANG, 2008), e os mais encontrados em feijão comum (KOSINSKA et al., 2011). É difícil estimar seu conteúdo em alimentos, pois podem estar presentes em diversas formas e pesos moleculares. No entanto, dímeros e trímeros são abundantemente encontrados como catequinas, facilitando sua detecção (MANACH et al., 2004). Os hidrolisáveis consistem em um núcleo de açúcar, geralmente a glicose, no qual ácido gálico ou elágico são esterificados. Em ambos os taninos há grande quantidade de fenil hidroxilas adjacentes que conferem propriedades reativas a esses compostos (CHUNG et al., 1998).

R = H : procianidina
 R = OH : prodelphinidina

Figura 1- Estrutura de taninos condensados

FONTE: Isanga; Zhang, 2008

Taninos muitas vezes são considerados fatores antinutricionais, pois se associam à redução na digestibilidade de proteínas e carboidratos, além de reduzir a absorção de alguns minerais (MOURA et al., 2005). Sabe-se que tanto a maceração quanto a cocção tem papel importante na redução deste composto fenólico, pois durante o processamento os taninos podem migrar para a água de maceração e para o caldo de cocção, sendo possível que alguns deles se difundam para o endosperma do cotilédono e se liguem às proteínas (MKANDA et al., 2007). Essa perda aparente de taninos pelo cozimento não é devido à destruição química e sim devido a mudanças em sua solubilidade e reatividade (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008).

Flavonóides compartilham uma estrutura que consiste de 2 anéis aromáticos (A e B) ligados por três átomos de carbono, formando um heterocíclico oxigenado (anel C) (Figura 2). São divididos em seis subclasses, em função do tipo de heterocíclico formado: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (catequinas e proantocianidinas)

(Figura 3). Seus principais representantes são as formas glicosiladas quercetina e caempferol (PIETTA, 2000). Tem-se destacado que flavonóides podem influenciar o estado redox intercelular para interagir com proteínas específicas e ácidos nucleicos na sinalização intracelular, além de possuírem atividade antioxidante (HAN et al., 2009).

Figura 2 - Estrutura básica de flavonóides

FONTE: Pietta, (2000)

Figura 3 - Estruturas de flavonóides

FONTE: Manach et al., (2004)

Duas classes de ácidos fenólicos podem ser distinguidas: derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico (YEH; YEN, 2003), sendo esta última classe mais comum e constituída principalmente pelos ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (MANACH et al., 2004). Diferentes formas de ácidos fenólicos podem ser encontrados (Figura 4), tais como: agliconas (ácidos fenólicos livres), ésteres, glicosídeos e ou formando complexos (ROSS et al., 2009). Sabe-se que os ácidos fenólicos tem grande importância como precursores na síntese de outros compostos fenólicos em plantas (XU; CHANG, 2009).

R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	Nome comum
H	-OH	-OH	H	a	Ácido caféico
H	H	-OH	H	a	Ácido p-cumárico
H	-OCH ₃	-OH	H	a	Ácido ferúlico
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	Ácido sinápico
H	-OH	H	H	a	Ácido m-cumárico
H	-OH	-OH	-OH	b	Ácido gálico
H	-OH	-OH	H	b	Ácido protocatecuico
-OH	-OH	-OH	H	b	Ácido-2,3,4-trihidroxibenzóico*
H	H	-OH	H	b	Ácido p-hidroxibenzóico
-OH	H	H	-OH	b	Ácido gentísico
H	-OCH ₃	-OH	H	b	Ácido vanílico
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	Ácido siringico
H	-OH	-OH	H	c	Protocatecuico aldeído
H	-OCH ₃	-OH	H	c	Vanilina
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	Siringaldeído

*Ácido-2,3,4-trihidroxibenzóico não é um ácido fenólico de ocorrência natural. É utilizado como padrão interno.

Figura 4 - Estruturas de Ácidos fenólicos

FONTE: Robbins; Bean, (2004)

2.6 Atividade Antioxidante

De maneira geral, antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SHAMI; MOREIRA, 2004). Aplicando este conceito à indústria alimentícia, pode-se dizer que antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios, principalmente os insaturados, ou de outras moléculas ao inibirem a iniciação ou propagação da reação de oxidação em cadeia. Assim, evitam a formação de compostos como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos, que são potencialmente tóxicos à saúde humana (PASSOTTO et al., 1998). Nos sistemas biológicos os antioxidantes previnem ou reparam os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, radicais derivados de tióis (RS•), espécies reativas de cloro, espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (ANDRADE et al., 2007; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; RUDNICKI et al., 2007; BECHARA, 2009).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica, a lipoxigenase *in vitro* (SOUSA et al., 2007), processos aterogênicos e câncer (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992). Essa atividade antioxidante deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras, as quais desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres ou quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002). Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D`ARCE, 2000).

Um dos métodos mais utilizados atualmente para avaliar a atividade antioxidante utiliza o radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazil) e consiste na redução deste radical estável pela ação dos antioxidantes presentes na amostra. Essa alteração do radical DPPH• pode ser acompanhada através do decréscimo da absorbância a 517 nm (DUDONNÉ et al., 2009).

Outro método constantemente utilizado é o do ABTS, que se baseia na mensuração da habilidade dos compostos presentes na amostra de sequestrar o radical ABTS⁺ (2,2' – azinobis (3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfônico)), expresso como a capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). Assim como no método do DPPH, pode ser verificada a perda de coloração e consequente decréscimo da absorbância, porém a 734 nm (JENG et al., 2010).

Feijões comuns possuem atividade antioxidante devido à presença de ácidos fenólicos e flavonóides, principalmente taninos (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007b). A atividade de retirada de radicais desses grãos é de aproximadamente 79,6%, muito próxima de algumas leguminosas africanas (OBOH et al., 2009). A atividade antioxidante é de cerca de 5,8 a 6,4 μmol de equivalentes de Trolox. g^{-1} de feijão cru, de 7,3 a 11,9 μmol de equivalentes de Trolox. g^{-1} de feijão cozido sem macerar, e de 4,9 a 9,4 μmol de equivalentes de Trolox. g^{-1} de feijão cozido e macerado. Dessa forma, a simples cocção sem maceração de grãos de feijão promove redução significativa da atividade antioxidante em relação aos grãos crus e a maceração seguida de cocção contribui ainda mais com essa redução, sendo significativamente inferior à dos grãos cozidos sem macerar e à dos grãos crus (RANILLA et al., 2009).

2.7 Digestibilidade de proteínas

A digestão de proteínas se inicia na boca e pode ser dividida em fases gástrica, pancreática e intestinal, dependendo da origem das peptidases. O alimento é quebrado pela mastigação e pela mistura com a saliva e, então, engolido (OWUSU-APENTEN, 2002). No estômago, verifica-se que o suco gástrico contendo ácido clorídrico atua na desnaturação de proteínas, tornando-a mais suscetível à hidrólise por proteases, e que a pepsina cliva essa macromolécula em grandes peptídeos e alguns aminoácidos livres (COUTINHO et al., 2007). Estes produtos são então absorvidos no intestino delgado, mediados por enzimas provenientes do intestino e do pâncreas, e as frações não digeridas passam a funcionar como fibra ou são degradadas por microorganismos presentes no intestino grosso (OWUSU-APENTEN, 2002).

Segundo Mendes et al. (2007), a digestibilidade pode ser definida como um processo que engloba a hidrólise das proteínas pelas enzimas digestivas até aminoácidos e posterior absorção dos mesmos pelo organismo, sendo expressa em porcentagem. Portanto o valor nutricional da proteína é determinado pela sua digestibilidade, seu conteúdo de aminoácidos essenciais e pela disponibilidade dos mesmos (CARBONARO et al., 2000).

Estudos envolvendo digestibilidade *in vivo* utilizam animais com o intuito de simular o processo digestivo que ocorre em humanos. Para isso, normalmente são utilizados ratos ou camundongos, que são separados em grupos de acordo com a semelhança de peso, gênero, idade e tipo da dieta (KUBOTA et al., 2010). As pesquisas que envolvem digestibilidade *in vitro*, em contrapartida, visam simular as condições existentes no trato digestivo humano ao

utilizar associações enzimáticas para determinar a taxa de hidrólise (MARUATONA et al., 2010).

A digestibilidade protéica é um parâmetro nutricional que avalia o aproveitamento de uma fonte protéica, podendo ser influenciada por vários compostos (DÍAZ-BATALLA et al., 2006). A reduzida digestibilidade das proteínas do feijão (40 a 70%) e de outras leguminosas é multicausal, sugerindo a ação de fatores ligados à casca (taninos), aos cotilédones (inibidores de natureza protéica, como os inibidores de proteases e lectinas, e outros como taninos, fitatos, saponinas e alcalóides), à estrutura (compacta estrutura de suas proteínas, o que fornece resistência à hidrólise enzimática), à outros componentes do grão tais como amido, hemicelulose, fibras, minerais e outras proteínas, e ao processamento e armazenamento (PEREIRA; COSTA, 2002). No tocante a estrutura, por exemplo, grandes quantidades de folha- β , típica nas frações 7S e 11S de globulinas, podem limitar o acesso de enzimas proteolíticas. De forma semelhante, outros constituintes presentes em proteínas, incluindo carboidratos, podem aumentar essa resistência à hidrólise. Isso pode ser observado em albuminas, que possuem grande quantidade de pontes dissulfeto e carboidratos em sua estrutura (MONTROYA et al., 2010).

Em geral, grãos crus apresentam teores maiores de compostos antinutricionais em relação aos mesmos grãos cozidos. Assim, a desnaturação das proteínas tende a melhorar a digestibilidade, por melhorar a flexibilidade das proteínas e facilitar o acesso das enzimas proteolíticas. Sabe-se também que a maceração de grãos de feijão seguido de cocção pode aumentar a digestibilidade em 7 a 12%. No entanto, o tratamento térmico excessivo pode causar decréscimo na digestibilidade da proteína pela formação de ligações cruzadas (MARTÍN-CABREJAS et al., 2009).

A digestibilidade varia conforme a cultivar, sendo a dos grãos brancos melhor que a dos coloridos, fato associado ao teor e à natureza dos taninos da casca das variedades coloridas. Os taninos do feijão possuem a capacidade de formar complexos com a faseolina *in vitro*, basicamente por meio de interações hidrofóbicas, produzindo diminuição significativa na digestibilidade dessa proteína, tanto na forma nativa como na desnaturada, mesmo em concentrações elevadas de proteases. Também se observa uma correlação negativa entre o conteúdo de taninos e a digestibilidade protéica *in vivo*. As hipóteses acerca de sua ação seriam a formação de complexos com as proteínas do feijão durante o cozimento e ou com as enzimas digestivas, levando à sua inativação (MENDONÇA et al., 2003; SHAWRANG et al., 2011). O polifenol procura regiões da proteína para se ligar, sobretudo onde haja resíduos

prolil e aromáticos. Como resultado de interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio são formadas entre os grupos hidroxila do polifenol e os grupos polares da proteína (por exemplo, grupos amino, hidroxila e carboxila), levando à agregação e precipitação desta. A associação depende do tamanho molecular e flexibilidade conformacional dos polifenóis, bem como da composição de aminoácidos e estrutura das proteínas (KOSINSKA et al., 2011).

Os polifenóis livres inibem várias enzimas digestivas em sistemas *in vitro*. Esses compostos estão envolvidos nas ligações da lignina com os carboidratos da parede celular e essa associação reduz a digestibilidade. Há também o fato de os fenóis simples precipitarem as proteínas pela formação de um revestimento hidrofóbico, semelhante à complexação taninos-proteínas (DELFINO, CANNIATTI-BRAZACA, 2008).

Referências

- ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P.; CARNEIRO, J.E.S.; MELO, L.C.; PAULA JÚNIOR, J.; PEREIRA, H.S.; MARTINS, M.; PEREIRA FILHO, I.A.; MOREIRA, J.A.A.; DOS SANTOS, J.B.; DEL GIÚDICE, M.P.; VIEIRA, R.F.; DEL PELOSO, M.J.; DE FARIA, L.C.; TEIXEIRA, H.; CARNEIRO, P.C.S. **Valor e uso de feijoeiro comum de grãos tipo carioca em Minas Gerais no período de 2007 a 2009**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/40005/1/4116.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2011.
- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of Rosemary and orégano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 197-203, may/Aug. 2000.
- AMAROWICZ, R.; DYKES, G.A.; PEGG, R.B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. **Fitoterapia**, Milano, v. 79, p. 217-219, 2008.
- ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.
- APARICIO-FERNANDEZ, X.; MANZO-BONILLA, L.; LOARCA-PIÑA, G. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, p. 73-78, 2005.
- BECHARA, E.J.H. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

BONETT, L.P.; BAUMGARTNER, M.S.T.; KLEIN, A.C.; SILVA, L.I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 235-246, set. 2007.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 55-128, 2003.

BURATTO, J.S.; CIRINO, V.M.; SCHOLZ, M.B.S.; LANGAME, D.E.M.; FONSECA JÚNIOR, N.S.; PRÊTE, C.E.C. Variabilidade genética e efeito do ambiente para o teor de proteína em grãos de feijão. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 593-597, 2009.

CAMPOS-VEGA, R.; REYNOSO-CAMACHO, R.; PEDRAZA-ABOYTES, G.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; GUZMAN-MALDONADO, S.H.; PAREDES-LOPES, O.; OOMAH, B.D.; LOARCA-PIÑA, G. Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 59-65, 2009.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 742-749, 2000.

CARVALHO, E.P.; WANDERLEY, A.L. Avaliação de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) para o plantio em sistema orgânico no Distrito Federal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 605-611, mai/jun. 2007.

CHUNG, K-T.; WONG, T.Y.; WEI, C-I.; HUANG, Y-W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CONAB – **Centro Nacional de Abastecimento**, 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 16 ago.2010.

COUTINHO, V.F.; MENDES, R.R.; ROGERO, M.M. Bioquímica e metabolismo de proteínas e aminoácidos. In: SILVA, S.M.C.S.; MURA, J.D.P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Ed. Roca, 2007. cap.1: p. 3-20.

DA SILVA, C.O.; GOMES, J.C.; COSTA, N.M.B.; ANDRADE, N.J.; MINIM, V.P.R. Caracterização nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) após processamento térmico. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 53, n. 309, p. 528-538, set/out., 2006.

DE FARIA, L.C.; DEL PELOSO, M.J.; MELO, L.C.; DA COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; DÍAZ, J.L.C.; DE FARIA, J.C.; DA SILVA, H.T.; SARTORATO, A.; BASSINELLO, P.Z.; TROVO, J.B.F. BRS Cometa: a carioca common bean cultivar with erect growth habit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, p. 167-169, 2008.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos. **Visão acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, jan/jun. 2004.

DELFINO, R.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Polifenóis e sua interação com a digestibilidade e tempo de cocção em feijão comum. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 401-407, out./dez., 2008.

DELFINO, R.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade protéica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 308-312, jun. 2010.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, p. 3-24, 1976.

DÍAZ, A.M.; CALDAS, G.V.; BLAIR, M.W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 595-601, 2010.

DÍAZ-BATALLA, L.; WIDHOLM, J.M.; FAHEY JR., G.C.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; PAREDES-LÓPEZ, O. Chemical components with health implications in wild and cultivated mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2045-2052, 2006.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1768-1774, 2009.

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

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2005a. Disponível em: <<http://www.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 15ago.2010.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_26_243200313234.html>. Acesso em: 13 Nov.2011.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2011b. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_95_1662003114721.html>. Acesso em: 17 Nov. 2011.

FAGERIA, N.K.; BARBOSA FILHO, M.P.; DA COSTA, J.G.C. Potassium-use efficiency in common bean genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 12, p. 1937-1945, 2001.

FEREGRINO-PÉREZ, A.A.; BERUMEN, L.C.; GARCÍA-ALCOCER, G.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; RAMOS-GOMEZ, M.; REYNOSO-CAMACHO, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; LOARCA-PIÑA, G. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 8737-8744, 2008.

FIALHO, L.S.; GUIMARÃES, V.M.; DE BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; DIAS, L.A.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; JOSÉ, I.C.; REZENDE, S.T. Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, p. 87-89, 2006.

FREITAS, R.L.; TEIXEIRA, A.R.; FERREIRA, R.B. Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1682-1687, 2004.

FONSECA, J.R.; MARQUES, E.M.G.; VIEIRA, E.H.N.; SILVA, H.T. Algumas características do germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletado no Espírito Santo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 314, p. 358-362, 2007.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of naturally acid-soluble proteins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on *in vitro* digestibility determination. **Food Chemistry**, Barking, v. 62, n. 3, p. 315-323, 1998.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Atividade inibitória de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): avaliação crítica dos métodos de determinação. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 51, n. 4, p. 386-394, 2001.

GOULART, M.M.P.; WALKER, R.; GONÇALVES, A.H.; COSTA, K.A.P.; BRAZ, A.J.B.P. Crescimento vegetativo de cultivares de feijoeiros submetido a dois níveis de luminosidades. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 3, n. 3, p. 31-39, set/dez. 2010.

GUARNIEI, C.C.O.; LEMOS, L.B.; FARINELLI, R. **Desempenho Produtivo, Nutricional e Tecnológico de Genótipos de Feijão Cultivados na época de inverno-primavera em Jaboticabal (SP)**. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2009, Rio Preto. Jaboticabal: UNESP, 2009. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35790317839.pdf>. Acesso em: 17 Nov. 2011.

HAN, R-M.; TIAN, Y-X.; LIU, Y.; CHEN, C-H.; AI, X-C.; ZHANG, J-P.; SKIBSTED, L.H. Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 3780-3785, 2009.

HELBIG, E.; DE OLIVEIRA, A.C.; QUEIROZ, K.S.; REIS, S.M.P.M. Effect of soaking prior to cooking on the levels of phytate and tannin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the protein value. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Osaka, v. 49, p. 81-86, 2003.

HERNÁNDEZ-SALAZAR, M.; OSORIO-DIAS, P.; LOARCA-PIÑA, G.; REYNOSO-CAMACHO, R.; TOVAR, J.; BELLO-PÉREZ, L.A. In vitro fermentability and antioxidant capacity of the indigestible fraction of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), lentils (*Lens culinaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 1417-1422, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201007_7.shtm>. Acesso em: 16 ago.2010.

ISANGA, J.; ZHANG, G-N. Soybean bioactive components and their implications to health – A review. **Food Reviews International**, New York, v. 24, p. 252-276, 2008.

ISLAM, F.M.A.; RENGIFO, J.; REDDEN, R.J.; BASFORD, K.E.; BEEBE, S.E. Association between seed coat polyphenolics (Tannins) and disease resistance in common bean. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 58, p. 285-297, 2003.

JENG, T.L.; SHIH, Y.J.; LAI, C.C.; WUA, M.T.; SUNG, J.M. Anti-oxidative characterisation of NaN₃-induced common bean mutants. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, p. 1006–1011, 2010.

KOSINSKA, A.; KARAMAC, M.; PENKACIK, K.; URBALWICZ, A.; AMAROWICZ, R. Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (*Vicia faba* Major) yield soluble and non-soluble complexes. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 233, p. 213-222, 2011.

KUBOTA, M.; SAITO, Y.; MASUMURA, T.; KUMAGAI, T.; WATANABE, R.; FUJIMURA, S.; KADOWAKI, M. Improvement in the *In vivo* digestibility of rice protein by alkali extraction is due to structural changes in prolamin/protein body-I particle. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 3, p. 614-619, 2010.

LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 50, p. 6592-6598, 2002.

LOPES JÚNIOR, C.O. **Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina**. 2008. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MACHADO, C.M.; FERRUZZI, M.G.; NIELSEN, S.S. Impact of the Hard-to-Cook Phenomenon on Phenolic Antioxidants in Dry Beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 3102–3110, 2008.

MADHUIJITH T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 85-90, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTÍN-CABREJAS, M.A.; AGUILERA, Y.; PEDROSA, M.M.; CUADRADO, C.; HERNÁNDEZ, T.; DÍAZ, S.; ESTEBAN, R.M. The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, p. 1063-1068, 2009.

MARTÍNEZ-MANRIQUE, E.; JACINTO-HERNÁNDEZ, C.; GARZA-GARCÍA, R.; CAMPOS, A.; MORENO, E.; BERNAL-LUGO, I. Enzymatic changes in pectic polysaccharides related to the beneficial effect of soaking on bean cooking time. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, p. 2394-2398, 2011.

MARUATONA, G.N.; DUODU, K.G.; MINNAAR, A. Physicochemical, nutritional and functional properties of marama bean flour. **Food Chemistry**, Barking, v.121, p. 400-405, 2010.

MENDES, F.Q.; M.G.A.; CARDOSO, L.R.; COSTA, N.M.B.; SANT'ANA, R.C.O. Digestibilidade protéica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com ausência ou presença do inibidor de tripsina Kunitz e das isozimas lipoxigenases. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 1, p. 14-21, Jan./Mar. 2007.

MENDONÇA, C.V.C.E.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; MORAIS, A.R. Quantificação de polifenóis e digestibilidade protéica de famílias de feijoeiro comum. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 858-864, jul/ago, 2003.

MKANDA, A.V.; MINNAAR, A.; KOCK, H.L. Relating consumer preferences to sensory and physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 2868-2879, 2007.

MONTOYA, C.A.; LETERME, P.; VICTORIA, N.F.; TORO, O.; SOUFFRANT, W.B.; BEEBE, S.; LALLÈS, J-P. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 2183-2191, 2008.

MONTOYA, C.A.; GOMEZ, A.S.; LALLÈS, J-P.; SOUFFRANT, W.B.; BEEBE, S.; LETERME, P. *In vitro* and *in vivo* protein hydrolysis of beans (*Phaseolus vulgaris*) genetically modified to express different phaseolin types. **Food Chemistry**, Barking, v. 106, p. 1225-1233, 2008b.

MONTOYA, C.A.; LALLÈS, J.P.; BEEBE, S.; LETERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 443-449, 2010.

MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SPOTO, M.H.F.; ARTHUR, V. Avaliação sensorial de feijão preto submetido à radiação de Cobalto-60. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 370-374, jun. 2005.

NEVES, V.A.; SILVA JR., S.I.; DA SILVA, M.A. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas do tremoço-doce (*Lupinus albus* L.), var. multolupa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 832-840, out/dez. 2006.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A.O.; AKINDAHUNSI, A.A. Changes in polyphenols distribution and antioxidant activity during fermentation of some underutilized legumes. **Food Science and Technology International**, London, v. 15, n.1, p. 41-46, 2009.

OWUSU-APENTEN, R.K. **Food proteins analysis: quantitative effects on processing**. New York: Marcel Dekker, 2002. 447p.

PARK, S.J.; KIM, T.W.; BAIK, B-K. Relationship between proportion and composition of albumins, and *in vitro* protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 1719-1725, 2010.

PASSOTTO, J.A.; PENTEADO, M.V.C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante do β -caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 68-72, jan/apr. 1998.

PERAZZINI, R.; LEONARDI, D.; RUGGERI, S.; ALESIANI, D.; D'ARCANGELO, G.; CANINI, A. Characterization of *Phaseolus vulgaris* L. landraces cultivated in central Italy. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 63, p. 211-218, 2008.

PEREIRA, C.A.S.; COSTA, N.M.B. Proteínas do feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (germ-free). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 5-14, jan./abr., 2002.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIRES, C.V. **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro de proteínas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. 2002. 80p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

PORTUGAL, J.R.; ARF, O.; RODRIGUES, R.A.F.; GITTI, D.C.; CASTAN, D.O.C. Comportamento de cultivares de feijão no período “de inverno” em Selvíria-MS. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2009, Rio Preto. Jaboticabal: UNESP, 2009. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35373402818.pdf>. Acesso em: 17 Nov.2011.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A.J.; COSTA, N.M.B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 200-213, jan/mar. 2008.

RANILLA, L.G.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Effect of Different Cooking Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Some Selected Brazilian Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5734–5742, 2009.

RIOS, A.O.; DE ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (supl), p. 39-45, dez. 2003.

ROBBINS, R.J.; BEAN, S.R. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1038, p. 97-105, 2004.

ROCHA-GUZMÁN, N.E.; ANNETE, H.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; IBARRA-PÉREZ, F.J.; ZAMBRANO-GALVÁN, G.; GALLEGOS-INFANTE, J.A. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, Barking, v. 103, p. 521–527, 2007.

ROCHA-GUZMÁN, N.E.; GONZÁLEZ-LAREDO R.F.; IBARRA-PÉREZ, F.J.; NAVA-BERÚMEN, C.A.; GALLEGOS-INFANTE, J.A. Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 31–35, 2007b.

ROSS, K.A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S.D. A comparative study on the phenolic acids indentified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, Barking, v.113, p. 336-344, 2009.

RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M.R.; PEREIRA, T.V.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 719-724, 2007.

SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T.; PRATISSOLI, D.; DOS REIS, E.F. Influência de desfolhas artificiais para simular perdas na produção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Xamego). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 457-463, jul/set. 2010.

SEBASTIÁ, V.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M.J. Effects os legume processing on calcium, iron and zinc contents and dialysabilities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 1180-1185, 2001.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr/jun. 2004.

SHARMA, P.; KAUL, S.; DHAR, M.K. Can phaseolin patterns help resolve the *Phaseolus-Vigna* complex? **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, p. 1573-1578, 2006.

SHAWRANG, P.; SADEGHI, A.A.; BEHGAR, M.; ZARESHAHI, H.; SHAHHOSEINI, G. Study of chemical compositions, anti-nutritional contents and digestibility of electron beam irradiated sorghum grains. **Food Chemistry**, Barking, v.125, p. 376-379, 2011.

SILVA, M.A.; NEVES, V.A.; LOURENÇO, E.J. Frações protéicas e globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), cv IAC-Marrocos. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 12, p. 131-149, 2001.

SILVA, A.G.; ROCHA, L.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 20, n. 4, out./dez. 2009.

SKOWRONSKI, L.; DEL GIÚDICE, M.P.; BORÉM, A.; DIAS, D.C.F.S.; CARNEIRO, G.E.S.; CECON, P.R. Qualidade tecnológica de grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) colhidos em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 56-63, 2003.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p.71-81, jan/abr. 2002.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-357, 2007.

TAYLOR, M.; CHAPMAN, R.; BEYAERT, R.; HERNÁNDEZ-SEBASTIÁ, C.; MARSOLAIS, F. Seed storage protein deficiency improves sulfur amino acid content in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): redirection of sulfur from γ -glutamyl-S-methyl-cysteine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 5647-5654, 2008.

TOLEDO, T.C.F.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 355-360, abr/jun. 2008.

YEH, C-T.; YEN, G-C. Effects os phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1474-1479, 2003.

YIN, S-W.; TANG, C-H.; WEN, Q-B.; YANG X-Q. Effects of acylation on the functional properties and *in vitro* trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 9, p. 488-494, 2009.

3 EFEITO DA COCÇÃO NO TEOR DE POLIFENÓIS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FEIJÕES DE DIFERENTES CORES

Resumo

Foram investigados os efeitos do processamento térmico e da maceração no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de feijões brancos, marrons e pretos. Analisaram-se teores de taninos utilizando vanilina – HCl, fenólicos totais utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu*, e atividade antioxidante, por meio dos métodos DPPH e ABTS. Todas as análises foram feitas em triplicata, com seis repetições, e os resultados analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade no programa estatístico SISVAR 5.3. Feijões brancos apresentaram os menores teores de taninos e a cocção exerceu efeito significativo na redução desses compostos apenas nas cultivares marrom e preta. O feijão marrom cru apresentou o maior teor de fenólicos totais, diferindo significativamente dos feijões cozidos. Para o método ABTS, apenas a cultivar marrom crua diferiu dos outros tratamentos. No método DPPH, os grãos marrons e pretos na forma crua apresentaram a maior atividade antioxidante e redução significativa com a cocção. Em contrapartida, a maceração apenas foi significativa para a redução da atividade antioxidante da cultivar preta. A cocção e a maceração seguida de cocção reduziram significativamente os teores de fenóis e a atividade antioxidante dos feijões, apesar de a maceração ter aumentado significativamente a quantidade de fenólicos totais em feijão preto.

Palavras-chave: Taninos condensados; Tratamento térmico; Compostos bioativos

Abstract

Effects of thermal and soaking processes on phenolic components and antioxidant activity of beans were investigated. Condensed tannin content (CTC) using vanillin – HCl, total phenolic content (TPC) following *Folin-Ciocalteu* method and the antioxidant properties following DPPH and ABTS methods were analyzed. White beans had the lowest CTC and the autoclaving significantly decreased the analyzed components. Only in the colored varieties the raw brown bean had the highest levels of phenolic compounds, differing from the other treatments. In the ABTS method, only the raw brown bean differed from the other treatments. In the DPPH method, the brown and black raw beans had the greatest antioxidant activity with significant reduction by autoclaving. However, the soaking process significantly decreased the antioxidant activity in black beans. Although the autoclaving decreased CTC, TPC and antioxidant content of beans, the soaking process in some cases increased contents of the compounds analyzed.

Keywords: Condensed tannin contents; Thermal treatment; Bioactive compounds

3.1 Introdução

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa de importante consumo no Brasil (consumo per capita aproximado de 17 kg/ano), é uma das mais importantes fontes de proteínas, calorias, vitaminas do complexo B e minerais como Fe, Zn, Ca, Mg, Mn e Cu (SANTOS et al., 2010; DÍAZ et al., 2010). Também é excelente fonte de fitoquímicos e

componentes nutracêuticos, os quais exercem potenciais efeitos fisiológicos. Dentre eles, tem-se: fibras, inibidores de protease, ácido fítico e polifenóis (taninos condensados, flavonóides glicosilados e antocianinas) (ESPINOSA-ALONSO et al., 2006). Sabe-se que os polifenóis desempenham atividades anticarcinogênicas, antimutagênicas e antioxidantes (APARICIO-FERNANDEZ et al., 2005; OOMAH et al., 2005) e, por isso, são extremamente importantes na inibição de mecanismos oxidativos pelo fato de sequestrarem radicais livres e espécies reativas de oxigênio, quelarem catalisadores metálicos, ativarem enzimas antioxidantes e inibirem oxidases (CARDADOR-MARTÍNEZ et al., 2002; MACHADO et al., 2008).

Em *Phaseolus vulgaris*, compostos fenólicos são encontrados em pequenas quantidades nos cotilédones e em maior proporção no tegumento, sendo responsáveis pela coloração do mesmo, além de protegerem as sementes contra patógenos e predadores (BOATENG et al., 2008; OOMAH et al., 2010). Os taninos são flavonóides poliméricos que compõem pequena parte de um amplo e diverso grupo de compostos fenólicos produzidos por plantas como metabólitos secundários (DÍAZ et al., 2010). Fatores ambientais, tais como o local de crescimento, bem como fatores genéticos (cultivares) influenciam no nível desses compostos bioativos (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007a).

A atividade antioxidante pode ser medida por diversos métodos. Um deles é o do DPPH, que utiliza o radical livre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A redução do DPPH por um antioxidante resulta em queda da absorbância em 517 nm (DUDONNÉ et al., 2009). Assim, o grau de descoloração da solução indica a eficiência de retirada de radicais livres da substância adicionada. Outro método para determinar a atividade antioxidante é o do ABTS e se baseia na mensuração da habilidade dos compostos presentes em cada grão de sequestrar o radical 2,2'-azinobis (3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfônico) (ABTS⁺). Esses métodos são expressos como capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) (JENG et al., 2010).

Nutricionistas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) mensuraram os níveis de antioxidantes de mais de 100 alimentos ricos em antioxidante e descobriram que três tipos de feijão ficaram entre as 4 primeiras posições na lista dos 10 alimentos ricos em antioxidantes. No entanto, os benefícios desses grãos para a saúde humana dependem estritamente de seu processamento, visto que eles devem ser cozidos ou processados antes do consumo. Esse processamento, não só melhora o sabor e a palatabilidade de leguminosas, mas também aumenta a biodisponibilidade de nutrientes, reduz os fatores

de flatulência e provoca uma série de mudanças nas características físicas e na composição química dos grãos (XU; CHANG, 2009).

O propósito deste estudo foi investigar os efeitos do processamento térmico e da maceração no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de feijões de diferentes colorações.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Cultivares de feijões e preparo das amostras

Os grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) - Xamego (preto), BRS9435-Cometa (marrom) e G-2358 (branco) - foram doados pela EMBRAPA - Centro de pesquisa Arroz e Feijão, sendo analisados os grãos de feijão cru e após processamento térmico.

Para as análises das amostras cruas, os grãos foram armazenados em temperatura de refrigeração (4°C) até o momento das determinações, quando foram triturados em moinho de facas e peneirados em malha de 30 *mesh* para obter uma amostra homogênea. Os grãos destinados à realização das análises das amostras cozidas foram divididos em dois tratamentos: Tratamento 1- maceração por 10 horas em água destilada, com posterior troca de água e cozimento em autoclave à 121°C por 10 minutos; Tratamento 2- cozimento em autoclave à 121°C por 10 minutos. Após a cocção, as amostras foram liofilizadas até secarem e, posteriormente, armazenadas a -26°C. A moagem dos grãos cozidos foi realizada no momento das análises nas mesmas condições das amostras cruas.

3.2.2 Quantificação de Taninos condensados

Taninos foram determinados de acordo com o procedimento utilizando vanilina – HCl, com posterior leitura da absorbância em 500 nm (PRICE et al., 1980). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes (mgEq) de catequina.g⁻¹ de amostra. Inicialmente, os grãos moídos (1,5 g e 2,0 g de G2358; 0,6 g e 1,5 g de Cometa; e 0,8 g e 2,0 g de Xamego, crus e cozidos, respectivamente) foram submetidos à extração em 10 mL de metanol durante 20 minutos. Centrifugou-se a 2.078 x g durante 20 minutos e posteriormente os sobrenadantes tiveram seus volumes acertados com metanol em balões de 10 mL. Iniciou-se a reação por meio de agitação a 30°C durante 20 minutos das soluções contendo 1 mL dos extratos centrifugados e 5 mL da mistura metanólica de vanilina 1% – HCl 8%. A curva-padrão de catequina foi construída nas concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg.mL⁻¹, em metanol

e mistura de vanilina – HCl. Para corrigir a interferência natural dos pigmentos presentes nos grãos, um branco foi preparado com metanol e HCl 4%.

3.2.3 Fenólicos Totais

A determinação da concentração de fenólicos totais foi realizada segundo metodologia descrita por Swain e Hillis (1959). Realizou-se extração de 0,5 g de amostra com 50 mL de etanol, seguida de centrifugação a 63 x g por 15 minutos. Adicionou-se à 0,5 mL dos sobrenadantes 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de carbonato de sódio. Após agitação durante 30 minutos a 37°C em banho-maria, foi feita a leitura de absorbância a 660 nm. Os resultados foram expressos em mgEq de catequina.g⁻¹ de amostra, por meio de interpolação dos dados com uma curva-padrão de catequina nas concentrações de 0 a 0,16 mg.mL⁻¹, etanol, água deionizada, reagente Folin-Ciocalteu e Na₂CO₃.

3.2.4 Determinação da capacidade antioxidante dos grãos de feijão

3.2.4.1 Método DPPH

Utilizou-se o método do DPPH proposto por Brand-Williams et al. (1995). Foram pesados 0,8 g e 1,0 g de feijão cru e cozido, respectivamente, para as cultivares BRS9435-Cometa e Xamego; enquanto que, para a linhagem G-2358 foram pesados 3,0 g para todos os tratamentos. Em seguida, as amostras foram diluídas em 10 mL de etanol, agitadas em mesa agitadora por 15 minutos e em seguida transferidas pra tubos de centrífuga, sendo submetidas à centrifugação por 10 minutos a 519 x g. Pipetou-se 500 µL do sobrenadante em tubo de ensaio e adicionou-se 3 mL de etanol e 300 µL da solução de DPPH. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 45 minutos, no escuro, e as leituras das absorbâncias realizadas em 517 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em miligramas da capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).g⁻¹ de amostra.

3.2.4.2 Método ABTS

A atividade antioxidante também foi determinada pela mensuração da habilidade dos compostos presentes em cada grão de sequestrar o radical ABTS⁺. Foi expresso como a capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), de acordo com o método proposto por Re et al. (1999), Van Den Berg et al. (1999) e Arts et al. (2004) com modificações. O cátion ABTS⁺ foi preparado em frasco âmbar por meio da mistura de 6,62 mg de persulfato de potássio (2,45 mM) e 38,4 mg de ABTS (7 mM) em 10 mL de água deionizada, sendo posteriormente mantido no escuro durante 12 a 16 horas em temperatura de 25°C para

liberação dos radicais do ABTS. A solução padrão de Trolox foi elaborada por dissolução de 5 mg de Trolox em 10 mL de etanol. Antes da realização das leituras das amostras, o ABTS⁺ foi diluído em etanol em uma proporção de 1:99, e a absorbância ajustada para $0,700 \pm 0,002$ em espectrofotômetro a 734 nm. Utilizaram-se os mesmos sobrenadantes obtidos no método do DPPH. Pipetou-se 20 µL de cada sobrenadante e à estes, foi adicionado 2 mL de solução diluída de ABTS. Foi feita leitura a 734 nm dos tempos zero e 5 minutos. Uma curva padrão foi elaborada utilizando-se concentrações de Trolox de 250 a 2000 µM, etanol e ABTS, e os resultados expressos em mg de TEAC.g⁻¹ de amostra.

3.2.5 Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. As análises foram feitas em triplicata, com seis repetições, e os resultados analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade no programa estatístico SISVAR 5.3.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Quantificação de taninos condensados

Na Tabela 1 são encontrados os teores de taninos para os diferentes grãos avaliados e seus respectivos tratamentos.

Tabela 1 - Teor de Taninos em mgEq de catequina.g⁻¹ de feijão cru, cozido e macerado e cozido

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	$0,00^1 \pm 0,00A^{2b^3}$	$10,71 \pm 0,97Aa$	$11,21 \pm 0,78Aa$
Cozido	$0,00 \pm 0,00Ac$	$0,55 \pm 0,02Ba$	$0,21 \pm 0,03Bb$
Macerado e cozido	$0,00 \pm 0,00Ab$	$0,35 \pm 0,07Ba$	$0,40 \pm 0,04Ba$

¹Médias de seis repetições $\pm$ desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Com relação ao efeito da cor do tegumento, percebe-se que a linhagem branca diferiu das demais cultivares e que o maior teor de taninos encontrado foi para a cultivar preta Xamego crua, não diferindo significativamente porém, da cultivar marrom BRS-Cometa.

A Tabela 1 mostra, ainda, que a cocção exerce efeito significativo na redução do conteúdo de taninos nas duas cultivares (BRS9435-cometa e Xamego). Na cultivar branca não foi detectada a presença de taninos, utilizando a metodologia em questão e, por esse motivo, não foi encontrada diferença com o cozimento. Para a cultivar Xamego, a cocção reduziu em

98,1% o conteúdo de taninos em relação à mesma cultivar crua e a maceração aumentou em 90,5% o teor de taninos comparado à cozida. Quanto a cultivar BRS9435-Cometa, a cocção reduziu em 94,9% o conteúdo de taninos em relação à mesma cultivar crua e a maceração diminuiu 36,4% do teor de taninos das amostras cozidas.

No estudo de Heimler et al. (2005), no qual não foram especificadas as cores das cultivares de feijão, foram encontrados teores de taninos condensados variando de 0,22 a 1,43 mgEq de catequina.g⁻¹ de feijão cru. Resultado semelhante (1,48 mgEq de catequina.g⁻¹ de feijão preto cru) foi encontrado no estudo de Xu e Chang (2007), quando utilizado metanol a 70% como solvente na extração. No entanto, Espinosa-Alonso et al. (2006) encontraram teor de taninos condensados variando de 9,49 a 35,70 mgEq de catequina.g⁻¹ de farinha de feijão cru, sendo o maior valor encontrado em feijões claros e o menor em uma mistura de grãos de diferentes colorações.

Assim como os baixos valores obtidos para os grãos cozidos neste estudo, Ranilla et al. (2009) não encontraram taninos condensados em feijões preto e marrom cozidos, sugerindo que isso foi devido à formação de complexos insolúveis entre proteínas e taninos e entre carboidratos e taninos em grãos íntegros, levando a não extração dos taninos pelo solvente e portanto a não detecção dos mesmos no método utilizando vanilina.

Há controvérsias sobre a relação existente entre a cor do tegumento das sementes e o conteúdo de taninos. Embora a maior parte dos relatos mencione que os maiores teores de taninos condensados sejam encontrados em sementes coloridas, há aqueles que relatam o contrário.

3.3.2 Teor de Fenólicos totais

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a quantificação de fenólicos totais presentes nos diferentes feijões analisados. Nela pode ser constatado que apenas nos grãos crus há diferença significativa entre todos os feijões analisados e que o maior conteúdo de polifenóis é encontrado em grãos da cultivar BRS9435-Cometa crua. Percebe-se que, para grãos brancos e marrons, a cocção reduziu significativamente o teor de fenólicos em 100% e 97%, respectivamente. Em grãos pretos, porém, a cocção e a maceração seguida de cocção exerceram efeito de redução da quantidade de fenólicos totais em relação aos crus, sendo este conteúdo aumentado pela maceração em 128,6% em relação aos grãos submetidos somente à cocção. Segundo Granito, Brito e Torres (2007), os processos térmicos reduzem os compostos fenólicos totais em leguminosas devido às possíveis quebras do anel aromático, o que pode

levar às reações de polimerização ou decomposição dessa estrutura aromática e, assim, não serem detectados na metodologia utilizada.

Tabela 2 - Teor de Fenólicos Totais em mgEq de catequina.g⁻¹ de feijão cru, cozido e macerado e cozido

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	0,19 ¹ ± 0,05A ² c ³	3,05 ± 0,49Aa	1,53 ± 0,12Ab
Cozido	0,00 ± 0,00Bb	0,09 ± 0,08Bb	0,21 ± 0,09Ca
Macerado e cozido	0,00 ± 0,00Bb	0,49 ± 0,22Ba	0,48 ± 0,20Ba

¹Médias de seis repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Os conteúdos médios de Fenólicos totais em extratos de acetona e metanol de cotilédones crus de feijão preto, feijão marrom e feijão branco, no estudo de Rocha-Guzmán et al. (2007a), foram de 15,6; 13,88; e 15,94 mgEq de catequina.g⁻¹ de feijão, valores muito superiores aos do presente estudo. Esse mesmo autor, em outro trabalho, explica que, em geral, quando a avaliação dos fenóis é feita por separação do tegumento e cotilédones, os valores obtidos são superiores aos da semente completa (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007b). Ademais, a utilização de acetona e metanol parece ter maior rendimento de extração de fenólicos em comparação com metanol ou acetona isoladamente (LUTHRIAA; PASTOR-CORRALES, 2006).

Madhujith et al. (2004) encontraram teores de fenólicos totais de 91,4; 44,0 e 4,9 mgEq de catequina.g⁻¹ de extrato de feijões crus marrom, preto e branco, respectivamente.

No trabalho de Bressani et al. (1980 apud Machado et al., 2008), foi encontrado teores de fenólicos totais para feijões pretos e brancos variando de 2,48 a 18,86 e 1,5 a 3,26 mgEq de catequina.g⁻¹ de feijão, respectivamente. No estudo de Cardador-Martínez et al. (2002), o teor de fenólicos totais nos grãos crus e íntegros de feijão Flor de Mayo FM-38 foi de 2,09 mgEq de catequina.g⁻¹ de feijão. Trata-se, portanto, de valores próximos aos encontrados neste estudo.

Boateng et al. (2008) observaram em seu estudo que feijão tipo carioca macerado apresentou teor de fenólicos totais maior do que soja e ervilha. Concluiu, ainda, que a maceração reduziu significativamente o teor de polifenóis. Machado et al. (2008) encontraram 0,38 mg de compostos fenólicos.g⁻¹ de feijão preto macerado e cozido, e 0,32 mg.g⁻¹ de feijão branco macerado e cozido. Sabe-se que maceração auxilia o processo de amolecimento dos

grãos, devolvendo a umidade aos mesmos, além de reduzir o tempo de cocção e tornar a digestão dos feijões mais fácil.

A discrepância nos resultados pode ser atribuída a vários fatores, que incluem o genótipo, práticas agronômicas, a maturidade na colheita, as condições do pós-colheita e do armazenamento, as condições climáticas, e os métodos analíticos incluindo solventes e tempos utilizados na extração (WANG et al., 2010).

3.3.3 Atividade antioxidante

Os resultados referentes à análise utilizando método DPPH são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antioxidante, método DPPH, expresso em mg TEAC.g⁻¹ de feijão cru, cozido e macerado e cozido

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	0,04 ¹ ± 0,01A ² b ³	0,43 ± 0,04Aa	0,43 ± 0,02Aa
Cozido	0,05 ± 0,01Ab	0,20 ± 0,02Ba	0,20 ± 0,03Ba
Macerado e cozido	0,05 ± 0,02Ab	0,18 ± 0,05Ba	0,14 ± 0,02Ca

¹Médias de seis repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Segundo a análise da Tabela 3, é possível notar que, tanto para feijões crus quanto para os cozidos macerados ou não, apenas a linhagem branca G-2358 diferiu estatisticamente das cultivares analisadas (BRS9435-Cometa e Xamego) e que, estas na forma crua apresentaram as maiores atividades antioxidantes. Quanto aos processamentos aplicados nos grãos, percebe-se que a cocção desempenhou redução significativa na atividade antioxidante das cultivares BRS9435-Cometa e Xamego, semelhante à redução (55,35%) encontrada por Granito et al. (2007). A maceração seguida de cocção, em contrapartida, apenas foi significativa para a redução da atividade antioxidante da cultivar Xamego.

No estudo de Ranilla et al. (2009), foi encontrado nos grãos sem macerar 7,3 µmolTEAC.g⁻¹ de feijão preto e 11,9 µmolTEAC.g⁻¹ de feijão marrom; nos grãos macerados encontrou-se 4,9 e 9,4 µmolTEAC.g⁻¹ de feijão preto e marrom, respectivamente; e nos grãos crus determinou-se 5,8 e 6,4 µmolTEAC.g⁻¹ de feijão preto e marrom, respectivamente. Comparativamente, modificando a unidade de apresentação dos resultados do presente estudo, obtem-se 0,76 µmolTEAC.g⁻¹ de feijão preto e marrom cozidos sem macerar; 0,53 e 0,68 µmolTEAC.g⁻¹ de feijão preto e marrom cozidos e macerados, respectivamente; e 1,63

$\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$ de feijão preto e marrom crus. Trata-se, portanto, de resultados muito inferiores aos do estudo mencionado acima e àqueles de Jeng et al. (2010), que encontraram 83,2 mg TEAC.g⁻¹ de feijão marrom cru. Oomah et al. (2005), entretanto, encontraram 1,33 e 1,07 $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$ de feijão preto e marrom crus, respectivamente, e Xu e Chang (2007) encontraram 0,78 $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$ de feijão preto cru, se aproximando dessa forma aos resultados encontrados neste estudo.

Sabe-se que a atividade antioxidante é afetada, dentre outros aspectos, pela polaridade e solubilidade dos compostos antioxidantes presentes na matriz analisada e que extratos de plantas contém uma mistura de compostos com diferentes polaridades, indicando que sua atividade antioxidante irá depender do sistema de extração utilizado (MADHUJITH et al., 2004).

Os resultados para a atividade antioxidante utilizando o radical ABTS são apresentados na Tabela 4. Nota-se o elevado e significativo potencial antioxidante da cultivar BRS9435-Cometa crua, em relação aos outros dois grãos crus. Potencial antioxidante também elevado para feijão marrom cru foi observado no trabalho de Jeng et al. (2010), no qual foi detectado 273,4 mg TEAC.g⁻¹ de feijão. No entanto, no trabalho de Madhujith e Shahidi (2005), foi encontrado 7,46 TEAC para grãos marrons crus, resultado inferior ao do presente estudo; 4,64 TEAC para grãos pretos crus, e atividade não significativa para grãos brancos crus, se assemelhando aos resultados aqui obtidos. Ainda com relação à cor das sementes, ambas as cultivares BRS9435-Cometa e Xamego apresentaram atividades antioxidantes estatisticamente superiores à da linhagem G-2358 quando houve cocção e maceração seguida por cocção.

Tabela 4 - Atividade antioxidante, método ABTS, expresso em mg TEAC.g⁻¹ de feijão cru, cozido e macerado e cozido

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	0,37 ¹ ± 0,10A ² b ³	68,61 ± 16,17Aa	5,11 ± 2,36Ab
Cozido	0,43 ± 0,06Ab	1,17 ± 0,32Ba	1,47 ± 0,28Ba
Macerado e cozido	0,19 ± 0,07Bb	1,23 ± 0,09Ba	1,33 ± 0,09Ba

¹Médias de seis repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Percebe-se que a cocção apresentou efeito significativo na redução da atividade antioxidante para os grãos marrom e preto, e que a maceração exerceu efeito significativo de redução para a linhagem branca.

No estudo de Machado et al. (2008), no qual foram analisados feijões brancos, vermelhos e pretos, foi observado maior atividade antioxidante em feijões pretos e menor em feijões brancos, confirmando os dados obtidos no presente estudo.

Wang et al. (2010), avaliando o conteúdo de polifenóis e a capacidade antioxidante de frutas, leguminosas e vegetais, concluíram que o grupo das leguminosas, constituído por feijões e soja, apresentou a maior capacidade de sequestro de radicais livres, enquanto que as frutas apresentaram os maiores teores de polifenóis.

Na Tabela 5, apresentam-se os índices de correlação de Pearson entre teor de fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método do DPPH para os diferentes grãos analisados. Constata-se que há correlação diretamente proporcional somente para os grãos crus, destacando-se importante correlação entre o teor de fenólicos e a atividade antioxidante para o feijão marrom cru. No estudo de Xu e Chang (2007) foi encontrada correlação não significativa ($r^2 = 0,35$) entre fenólicos totais e DPPH, sendo explicado que essa correlação é altamente dependente do sistema de extração utilizado.

Tabela 5 - Índice de Correlação entre Fenólicos Totais e DPPH de feijão cru, cozido e macerado e cozido

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	0,27 ¹	0,88	0,58
Cozido	-	-0,15	-0,08
Macerado e cozido	-	-0,97	-0,77

¹Índice de Correlação de Pearson.

Os índices de correlação entre teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método ABTS para os grãos analisados são encontrados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Índice de Correlação entre Fenólicos Totais e ABTS de feijão cru, cozido sem macerar e cozido macerado

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	0,62 ¹	0,96	0,58
Cozido sem macerar	-	0,36	0,11
Cozido macerado	-	0,41	-0,64

¹Índice de Correlação de Pearson.

Por meio da análise da Tabela 6, percebe-se correlação significativa somente para grãos marrons crus, confirmando os resultados da correlação entre Teor de fenólicos e DPPH. Madhujith e Shahidi (2005) encontraram correlação elevada ($r^2 = 0,93$) entre o teor de fenólicos e TEAC, para grãos marrons, brancos e pretos crus. Dessa forma, possivelmente os

compostos fenólicos presentes nessas sementes marrons cruas são responsáveis por sua atividade antioxidante.

3.4 Conclusão

Apesar de a maceração e a cocção dos feijões terem mostrado reduzir taninos, compostos fenólicos e a atividade antioxidante da maior parte dos grãos analisados, além de a literatura já relatar seu efeito redutor também nos antinutrientes, tais como o inibidor de tripsina e o ácido fítico, a maceração aumentou significativamente a quantidade de fenólicos totais em feijão preto.

Referências

- APARICIO-FERNANDEZ, X.; MANZO-BONILLA, L.; LOARCA-PIÑA, G. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, p. 73-78, 2005.
- ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H-P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 8, p. 567–570, 2004.
- BOATENG, J.; VERGHESE, M.; WALKER, L.T.; OGUTU, S. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). **Food Science & Technology**, London, v. 41, p. 1541-1547, 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAH, B.D. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 6975-6980, 2002.
- DÍAZ, A.M.; CALDAS, G.V.; BLAIR, M.W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 595–601, 2010.
- DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1768-1774, 2009.

ESPINOSA-ALONSO, L.G.; LYGIN, A.; WIDHOLM, J.M.; VALVERDE, M.E.; PAREDES-LOPEZ, O. Polyphenols in Wild and Weedy Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4436-4444, 2006.

GRANITO, M.; BRITO, Y.; TORRES, A. Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 2801–2809, 2007.

HEIMLER, D.; VIGNOLINI, P.; DINI, M.G.; ROMANI, A. Rapid Tests to Assess the Antioxidant Activity of *Phaseolus vulgaris* L. Dry Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 3053-3056, 2005.

JENG, T.L.; SHIH, Y.J.; LAI, C.C.; WUA, M.T.; SUNG, J.M. Anti-oxidative characterisation of NaN₃-induced common bean mutants. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, p. 1006–1011, 2010.

LUTHRIAA, D.L.; PASTOR-CORRALES, M.A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, p. 205–211, 2006.

MACHADO, C.M.; FERRUZZI, M.G.; NIELSEN, S.S. Impact of the Hard-to-Cook Phenomenon on Phenolic Antioxidants in Dry Beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 3102–3110, 2008.

MADHUJITH, T.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of common beans(*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Lipids**, St. John`s, v. 11, p. 220–233, 2004.

MADHUJITH T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of food science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 85-90, 2005.

OOMAH, B.D.; CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, p. 935–942, 2005.

OOMAH, B.D.; CORBÉ, A.; BALASUBRAMANIAN, P. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 8225–8230, 2010.

PRICE, M.L.; HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeonpeas and mung beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, n. 2, p. 459-461, 1980.

RANILLA, L.G.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Effect of Different Cooking Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Some Selected Brazilian Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5734–5742, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROCHA-GUZMÁN, N.E.; ANNETE, H.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; IBARRA-PÉREZ, F.J.; ZAMBRANO-GALVÁN, G.; GALLEGOS-INFANTE, J.A. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, Barking, v. 103, p. 521-527, 2007a.

ROCHA-GUZMÁN, N.E.; GONZÁLEZ-LAREDO R.F.; IBARRA-PÉREZ, F.J.; NAVA-BERÚMEN, C.A.; GALLEGOS-INFANTE, J.A. Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 31-35, 2007b.

SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; SANTOS, M.R.; FARIA, L.C.; OLIVEIRA, I.P.; THUNG, M.D.T. Multivariate Characterization of Bean Varieties According to Yield Production, Mineral and Phenolic Contents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, p. 1917-1922, 2010.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. - The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

VAN DEN BERG, H.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, Barking, v. 66, p. 511-517, 1999.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, p. 159-166, 2007.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 4754-4764, 2009.

WANG, S.; MECKLING, K.A.; MARCONE, M.F.; KAKUDA, Y.; TSAO, R. Synergistic, Additive, and Antagonistic Effects of Food Mixtures on Total Antioxidant Capacities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 960-968, 2011.

4 ALTERAÇÕES NO PERFIL ELETROFORÉTICO E NA DIGESTIBILIDADE PROTÉICA DECORRENTES DA COMPLEXAÇÃO ENTRE FASEOLINA E POLIFENÓIS DE FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Resumo

Objetivou-se determinar os efeitos da complexação faseolina-tanino na digestibilidade protéica de feijões considerando-se o efeito do processamento térmico e da maceração. Foram analisados os rendimentos das extrações de polifenóis e faseolinas, o perfil eletroforético das proteínas e de seus complexos com polifenóis, e a digestibilidade protéica. Todas as análises foram feitas em triplicata, com três repetições, e os resultados analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade no programa estatístico SISVAR 5.3. O rendimento da extração mostrou-se baixo tanto para os compostos fenólicos quanto para as proteínas, nas condições utilizadas. No fracionamento dos polifenóis, encontrou-se maior rendimento de extração para a fração B e menor para a fração E, em todos os feijões e em todos os tratamentos. Pela análise dos géis de eletroforese, houve alteração no perfil eletroforético da proteína dos grãos após a ligação com os polifenóis. As bandas com maior peso molecular, principalmente na região de 50 kDa presentes nas faseolinas puras apresentaram menor intensidade quando houve a adição de polifenóis, tornando a região de 20kDa mais evidente. A digestibilidade das faseolinas de feijões crus variou de 95,67 a 97,66% e a de feijões cozidos de 90,44 a 97,02%. A análise de digestibilidade de faseolinas puras permitiu concluir que a maceração seguida de cocção somente exerceu influência significativa em grãos brancos e que essa alteração reduziu a digestibilidade da faseolina. De modo geral a ligação das faseolinas com os polifenóis aumentou o percentual de digestibilidade. O efeito esperado da complexação faseolina-frações de polifenóis em reduzir a digestibilidade da faseolina foi muito discreto e muitas vezes inexistente, e o de aumento da digestibilidade pela cocção com ou sem maceração também foi limitado.

Palavras-chave: SDS-PAGE; Faseolina; Fatores antinutricionais

Abstract

The objective was to determine the effects of complexation of phaseolin and tannin on protein digestibility of beans considering the effect of thermal processing and soaking. Were analyzed the yields of extraction of polyphenols and phaseolins, the electrophoretic profile of proteins and their complexes with polyphenols, and protein digestibility. All tests were performed in triplicate with three replicates, and the results analyzed by the Tukey test at 5% probability at SISVAR 5.3 statistical program. The yield of extraction was low for both phenolic compounds and proteins in the conditions used. In the fractionation of the polyphenols, a higher yield of extraction was found for B fraction and a lower for E fraction, for all beans and all treatments. For the analysis of electrophoresis gels, there were changes in the electrophoretic profile of protein from grains by complexation with polyphenols. The bands with higher molecular weight present in pure phaseolins, especially in the region of 50 kDa had a lower intensity when there was complexation with polyphenols, making the region of 20 kDa more evident. The digestibility of phaseolins from raw beans ranged from 95.67 to 97.66% and from the cooked beans from 90.44 to 97.02%. The analysis of digestibility of pure phaseolins concluded that soaking followed by cooking only exerted significant influence on white grains, reducing the digestibility of phaseolin. Generally, the complexation of phaseolin and polyphenols increased percentage of digestibility. The expected effect of complexation of fractions of polyphenols and phaseolins in reduce the

digestibility of phaseolins was very low and often non-existent, and the increase in the digestibility by cooking with or without soaking was also limited.

Keywords: SDS-PAGE; Phaseolin; Antinutritional factors

4.1 Introdução

Grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) contém entre 20% e 30% de proteínas (YIN et al., 2010), as quais são classificadas em quatro grupos: o primeiro das albuminas, que são hidrossolúveis e representam cerca de 20% das proteínas dessa leguminosa (PARK et al., 2010); o segundo grupo das globulinas, que correspondem a aproximadamente 50 a 70% da proteína total e são constituídas pelas faseolinas (ou vicilinas) e leguminas (SILVA et al., 2001); o terceiro das glutelinas, correspondendo a 20% do total de proteínas; e o quarto das prolaminas, representando 1,7% das proteínas de feijão comum (BONETT et al., 2007).

A faseolina é a globulina predominante (40 a 50% do total de proteínas) em *Phaseolus vulgaris* e tem seu valor nutritivo limitado pelo baixo teor de aminoácidos sulfurados e alta resistência à hidrólise enzimática (MONTROYA et al., 2008a). Entretanto, o tratamento térmico aumenta drasticamente a digestibilidade dessa proteína, aumentando relativamente o seu valor nutricional (MONTROYA et al., 2008b).

O baixo valor nutricional das proteínas de feijão comum é atribuído ao seu limitado conteúdo de aminoácidos biodisponíveis, à presença de fatores antinutricionais estáveis à cocção e à baixa digestibilidade dessas proteínas (LOPES JÚNIOR, 2008). A reduzida digestibilidade pode ser devido à formação de complexos proteína-tanino ou proteína-fitato; à inibição parcial das enzimas digestivas por polifenóis ou fitatos (TOLEDO; CANNIATTI-BRAZACA, 2008); à desfavorável conformação ou sequência de aminoácidos das proteínas; ou às interações proteína-proteína e proteína-carboidratos que ocorrem durante o tratamento térmico (MARQUEZ; LAJOLO, 1991).

Polifenóis podem formar complexos solúveis ou insolúveis com proteínas, promovendo queda na biodisponibilidade de ambos. A precipitação desse complexo é devido à formação de ligações hidrofóbicas (quando os polifenóis são mais apolares) ou pontes de hidrogênio (para polifenóis mais polares) em sua superfície (RICHARD et al., 2005). Essa precipitação ocorre quando quantidade crítica de moléculas de polifenóis se associa à molécula de proteína ou quando a proteína possui superfície suficiente para que ocorra a ligação aos polifenóis (NACZK et al., 2006). Dessa forma, quando há baixa concentração de proteínas, a precipitação é devido à formação de uma camada hidrofóbica de polifenóis na superfície da proteína (complexo solúvel). Quando a concentração de proteínas é elevada, a

precipitação resulta da combinação entre a ligação dos polifenóis às superfícies das proteínas e às ligações cruzadas de diferentes moléculas de proteína com polifenóis (complexo insolúvel) (KOSINSKA et al., 2011).

A interação proteína-polifenol depende do tamanho, da conformação e das cargas das moléculas de proteína; do tamanho, comprimento e flexibilidade da molécula de polifenol; do número e estereoespecificidade dos sítios de ligação das moléculas de proteína e polifenóis; além de ser afetada pela presença de surfactantes e ser pH-sensível (a precipitação máxima ocorre próximo ao ponto isoelétrico da proteína) (HAGERMAN et al., 1998).

A complexação entre taninos e proteínas promove o decréscimo na digestibilidade de feijões, porém sabe-se que a cocção pode melhorar o valor nutricional dos grãos na medida em que contribui para a eliminação de alguns fatores antinutricionais (REHMAN; SHAH, 2005). Ainda assim, a digestibilidade permanece limitada em função da alteração da estrutura primária das proteínas e pela permanência dos inibidores de proteases termoestáveis ou polifenólicos que interagem com as enzimas digestivas e ou com as proteínas do feijão (BONETT et al., 2007). A maceração de grãos de feijão seguida de cocção, da mesma forma que a cocção, pode aumentar a digestibilidade, mesmo que esse processo não contribua para a redução de todos os antinutrientes (MARTÍN-CABREJAS et al., 2009).

Nesse sentido, o propósito deste estudo foi determinar os efeitos da complexação faseolina-polifenóis na digestibilidade protéica de feijões submetidos ou não ao processamento térmico e à maceração.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Cultivares de feijões e preparo das amostras

Os grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) - Xamego (preto), BRS9435-Cometa (marrom) e G-2358 (branco) - foram doados pela EMBRAPA - Centro de pesquisa Arroz e Feijão, sendo analisados os grãos de feijão cru e após processamento térmico.

Para as análises das amostras cruas, os grãos foram armazenados em temperatura de refrigeração (4°C) até o momento das determinações, quando foram triturados em moinho de facas e peneirados em malha de 30 *mesh* para obter uma amostra homogênea. Os grãos destinados à realização das análises das amostras cozidas foram divididos em dois tratamentos: Tratamento 1- maceração por 10 horas em água destilada, com posterior troca de água e cozimento em autoclave à 121°C por 10 minutos; Tratamento 2- cozimento em autoclave à 121°C por 10 minutos. Após a cocção, as amostras foram liofilizadas até secarem

e, posteriormente, armazenadas a -26°C . A moagem dos grãos cozidos foi realizada no momento das análises nas mesmas condições das amostras cruas.

4.2.2 Extração de polifenóis

A extração foi realizada segundo Cardador-Martinez et al. (2006). Para cada 10 gramas de amostra moída foi adicionado 100 mL de metanol, agitando-se durante 24 horas a 70 rpm e 25°C . Após este período as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a $812 \times g$ e o sobrenadante formado colocado em balão para evaporar o metanol em rotaevaporador a 35°C com vácuo de $-92,1 \text{ KPa}$. Os extratos brutos obtidos foram congelados a -80°C e liofilizados. Foram realizadas cinco extrações para cada amostra.

4.2.3 Fracionamento do extrato bruto de polifenóis

O material obtido na extração foi separado em seis frações utilizando cromatografia em coluna aberta à vácuo, segundo metodologia proposta por Aparício-Fernandez et al. (2005). A quantia de 0,5 g do extrato bruto liofilizado foi diluído em 1 mL de metanol e vertido em coluna aberta com sílica gel (Sigma Aldrich, 13% CaSO_4). Os reagentes foram adicionados (conforme fluxograma abaixo) e as frações coletadas após cada passagem:

- 1- 50 mL de 100% éter de petróleo;
- 2- 50 mL de éter de petróleo:acetato de etila (1:1);
- 3- 50 mL de acetato de etila 100%.

Coleta da Fração A

- 4- 50 mL da mistura: 1 mL de acetato de etila + 49 mL de metanol/água (1:1);
- 5- 50 mL da mistura: 2,5 mL de acetato de etila + 47,5 mL de metanol/água (1:1);
- 6- 50 mL da mistura: 4 mL de acetato de etila + 46 mL de metanol/água (1:1);
- 7- 50 mL da mistura: 6 mL de acetato de etila + 44 mL de metanol/água (1:1);
- 8- 50 mL da mistura: 7,5 mL de acetato de etila + 42,5 mL de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração B

- 9 - 50 mL da mistura: 10 mL de acetato de etila + 40 mL de metanol/água (1:1);
- 10- 50 mL da mistura: 12,5 mL de acetato de etila + 37,5 mL de metanol/água (1:1);
- 11- 50 mL da mistura: 15 mL de acetato de etila + 35 mL de metanol/água (1:1);
- 12- 50 mL da mistura: 17,5 mL de acetato de etila + 32,5 mL de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração C

Coleta da Fração C

13- 50 mL da mistura: 20 mL de acetato de etila + 30 mL de metanol/água (1:1);
 14- 50 mL da mistura: 22,5 mL de acetato de etila + 27,5 mL de metanol/água (1:1);
 15- 50 mL da mistura: 25 mL de acetato de etila + 25 mL de metanol/água (1:1);
 16- 50 mL da mistura: 30 mL de acetato de etila + 20 mL de metanol/água (1:1);
 17- 50 mL da mistura: 35 mL de acetato de etila + 15 mL de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração D

18- 50 mL da mistura: 40 mL de acetato de etila + 10 mL de metanol/água (1:1);
 19- 50 mL da mistura: 45 mL de acetato de etila + 5 mL de metanol/água (1:1);
 20- 50 mL da mistura de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração E

21- 50 mL de metanol 100%;
 22- 50 mL de água 100%.

Coleta da fração F

Após a recuperação de cada fração acima, considerando que a fração A foi descartada por se constituir em uma fração de limpeza da coluna, as misturas foram colocadas em balão para evaporar os solventes em rotaevaporador. Os extratos resultantes foram congelados e liofilizados.

4.2.4 Extração da faseolina

Para a extração da faseolina, foi utilizada a metodologia proposta por Ahn et al. (1991), usando solução de sulfato de amônio. Pesou-se 6 gramas dos grãos moídos aos quais foram adicionados 100 mL de água deionizada gelada e 23,78 gramas de sulfato de amônio. As amostras de feijão foram agitadas por uma hora e meia, sendo posteriormente filtradas em algodão. Mais 2,378 gramas de sulfato de amônio foram adicionadas à solução, a qual manteve-se por mais uma hora sob agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 30.000 x g por 30 minutos à 4°C. O precipitado foi descartado; sendo utilizado somente o sobrenadante. A ele foi adicionado mais 8,72 gramas de sulfato de amônio e agitado por mais uma hora. Novamente as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições descritas acima, mas, nesta etapa, utilizou-se o precipitado, que é onde se encontra a faseolina. Este

precipitado foi acondicionado em membrana de diálise durante três dias em água deionizada sob refrigeração, sendo esta água trocada seis vezes/dia para a remoção dos sais presentes no meio. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -80°C . Todas as extrações foram realizadas em banho de gelo para evitar a degradação protéica.

4.2.5 Eletroforese SDS-PAGE

Utilizou-se a metodologia proposta por Laemmli (1970). Com as proteínas obtidas nas extrações, foi realizada a eletroforese em gel 10% de acrilamida para feijões crus e 12% de acrilamida para feijões cozidos, com voltagem de 120 V para grãos crus e de 80 V para grãos cozidos.

Para os complexos polifenol (brutos e frações)-faseolina de feijões crus, 2,5 mg de polifenol foram diluídos em 320 μL de etanol 10% e 20 mg de proteína foram diluídas em 400 μL de água deionizada, com posterior re-diluição (à 20 μL dessa solução-mãe de proteína adicionou-se mais 100 μL de água deionizada). Misturou-se 20 μL da solução etanólica de polifenol com 20 μL da solução diluída de proteína e, então, mantido em repouso a 25°C durante 5 minutos. Aos 40 μL da mistura anterior, foi acrescentado mais 40 μL de tampão da amostra e posteriormente mantido sob fervura durante 5 minutos. 30 μL da solução anterior e 20 μL de padrão foram adicionados aos poços do gel e então iniciada a corrida. Para a corrida das faseolinas puras, foram misturados 40 μL da solução diluída de proteína com 40 μL de tampão da amostra e os passos seguintes foram os mesmos descritos acima.

Para os complexos polifenol (brutos e frações)-faseolina de feijões cozidos, as soluções etanólicas de polifenóis e as soluções diluídas de proteína foram preparadas da mesma forma que para grãos crus. No entanto, misturou-se 17,5 μL da solução etanólica de polifenol com 35 μL da solução diluída de proteína e, então, mantido em repouso a 25°C durante 5 minutos. Foi acrescentado mais 22,5 μL de tampão da amostra e posteriormente mantido sob fervura durante 5 minutos. Foram adicionados 30 μL da solução anterior e 20 μL de padrão aos poços do gel e então iniciada a corrida. Para a corrida das faseolinas puras, foram misturados 35 μL da solução diluída de proteína com 15 μL de tampão da amostra e os passos seguintes foram os mesmos descritos acima.

Foi utilizado padrão de peso molecular 10 a 220 kDa da BenchMarkTM (Cat No. 10747-012).

4.2.6 Digestibilidade protéica

Foi utilizada a metodologia proposta por Akeson e Stahman (1964), a qual avalia a digestibilidade *in vitro* por meio da determinação da taxa de hidrólise por associações enzimáticas de pepsina e pancreatina, simulando as condições existentes no trato gastrointestinal.

Inicialmente, foi pesado 0,01 g de proteína e a ela adicionados 660 µL de solução pepsina-HCl. As amostras permaneceram por 3 horas a 37°C sob agitação em banho-maria. Em seguida, as amostras foram neutralizadas com 660 µL de NaOH 0,1 N e a elas adicionados 660 µL de solução de pancreatina. As amostras permaneceram durante 24 horas a 37°C sob agitação em banho-maria. Na etapa seguinte, foi retirado 1 mL da mistura e transferido para tubo de centrífuga. Foram adicionados 5 mL de ácido pícrico a 1% para precipitação das proteínas não digeridas, e o material centrifugado durante 30 minutos a 2.078 x g. Posteriormente, utilizou-se o método de Bradford para a quantificação de proteína, pipetando-se 200 µL da solução contendo a amostra em cubeta e a ela adicionando-se 1 mL de solução de Bradford. Após 2 minutos, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

As análises de digestibilidade foram realizadas com as faseolinas isoladamente, e com os complexos polifenol-proteína na proporção de 1/20 (polifenol/proteína, p/p), sendo analisado tanto o extrato bruto de polifenóis quanto as suas frações FB, FC, FD e FF.

4.2.7 Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. As análises foram feitas em triplicata, com três repetições, e os resultados analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade no programa estatístico SISVAR 5.3.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Rendimento das extrações de polifenóis e faseolinas

Na Tabela 1 são encontrados os rendimentos das extrações de polifenóis e faseolinas para os diferentes grãos avaliados e seus respectivos tratamentos.

Tabela 1 - Rendimento (%) das extrações de polifenóis brutos e das faseolinas de feijão cru, cozido e macerado e cozido

Cultivares	Rendimento (%)	
	Polifenóis	Faseolinas
	Cru	
G2358	2,2	9,51
BRS-Cometa	2,6	6,15
Xamego	3,6	5,67
	Cozido	
G2358	2,6	0,57
BRS-Cometa	3,0	0,46
Xamego	2,6	0,35
	Macerado e cozido	
G2358	2,0	0,46
BRS-Cometa	2,1	0,48
Xamego	3,0	0,42

Observando-se os rendimentos das extrações de polifenóis, percebe-se que não houve variação entre as cultivares dentro de um mesmo tratamento e tão pouco entre os diferentes tratamentos dados. Quanto às extrações das faseolinas, é notório o efeito do cozimento e da maceração seguida de cocção na redução do rendimento das extrações. Nota-se, portanto, que o rendimento da extração é baixo tanto para os compostos fenólicos quanto para as proteínas, nas condições utilizadas.

No estudo de Pires (2002), no qual foi utilizado NaCl 0,2M e azida sódica 0,02% para extrair as proteínas de feijões, foi encontrado rendimento de extração da fração globulina entre 32,77 e 39,03%, dependendo da variedade de feijão. No trabalho de Marquez e Lajolo (1981), utilizou-se NaCl 0,5N e ácido ascórbico 0,25M (pH 2,2) na extração de globulinas de feijão e foi encontrado 38,1% de extração de faseolina. As diferenças entre os resultados citados e os apresentados neste estudo podem ser devidas ao uso de metodologias de extração diferentes ou ao uso de solução salina em concentrações diferentes, o que promove diferenças nos graus de solubilização das globulinas.

4.3.2 Rendimento das frações de polifenóis

Na Tabela 2 são apresentados os rendimentos dos fracionamentos dos extratos de polifenóis dos diferentes feijões analisados.

Tabela 2 - Rendimento (%) das frações de polifenóis de feijão cru, cozido e macerado e cozido

Cultivar	Rendimento				
	FB	FC	FD	FE	FF
Cru					
G2358	52,48	14,02	11,16	0,38	0,68
BRS-Cometa	30,68	14,96	30,16	0,00	3,86
Xamego	46,6	14,46	1,4	2,4	0,62
Cozido					
G2358	39,66	8,62	11,76	0,00	2,16
BRS-Cometa	44,52	3,36	6,18	0,00	2,5
Xamego	52,64	13,36	21,8	3,52	2,2
Macerado e cozido					
G2358	42,88	14,16	16,78	0,16	1,44
BRS-Cometa	48,48	9,88	15,24	0,48	2,36
Xamego	8,02	6,58	7,62	0,44	1,08

FB, FC, FD, FE e FF: frações de polifenóis obtidos por meio de cromatografia em coluna aberta à vácuo.

A maior parte dos polifenóis eluíram nas primeiras frações FB, FC e FD. Devido o baixo rendimento da fração FE, esta foi inutilizada nas análises seguintes.

No trabalho de Aparício-Fernandez et al. (2005), os extratos brutos de polifenóis de feijão preto cru foram fracionados da mesma forma que neste trabalho, e os percentuais de pesos secos das frações FB, FC, FD, FE e FF foram de 0,8%, 4,7%, 11,5%, 24,9% e 54,2%, respectivamente. Observa-se que os rendimentos de cada fração de feijão preto cru do presente estudo (Tabela 2) não se assemelham aos do trabalho citado. Essa diferença pode ser devido às diferenças de cultivares, dos locais de plantio e às condições de solo e clima, influenciando diretamente na composição e distribuição dos metabólitos secundários das plantas.

A partir da análise da Tabela 2, nota-se que cada feijão apresentou padrão peculiar de distribuição de seus polifenóis, o que era de se esperar visto que as cores do tegumento, os aspectos inerentes a cada planta e também os tratamentos dados aos grãos influenciam no perfil de seus compostos fenólicos. As diferenças moleculares entre tais compostos interferem em sua polaridade e conseqüentemente na afinidade pelos solventes utilizados em cada fração coletada.

4.3.3 Eletroforese

Na Figura 1 são apresentadas as faseolinas dos feijões branco, marrom e preto crus. Comparativamente à proteína padrão, percebe-se que há predominância de bandas nas regiões próximas de 20 e 50 kDa.

Figura 1 - Eletroforese SDS-PAGE 10% corado com coomassie brilhant blue, para verificação das faseolinas de feijões crus. G – linhagem G2358; C – cultivar BRS9435-Cometa; X – cultivar Xamego; P – padrão de proteína

No trabalho de Barker et al. (1976), foi identificado por eletroforese SDS-PAGE que a principal proteína de reserva de feijão comum possui duas subunidades, cujos pesos moleculares são 47 e 50 kDa, além da identificação de outros componentes com pesos moleculares de 60, 32, 23 e 20 kDa. Perfil semelhante de distribuição dos peptídeos dessa proteína foi encontrado no estudo de Montoya et al. (2008), que ao avaliarem 43 tipos de faseolinas, identificaram que suas subunidades se encontravam predominantemente entre as bandas de 41,1 e 54,7 kDa. Taylor et al. (2008) também evidenciaram a faseolina de feijão cru predominantemente por bandas na região de 45 kDa, assim como Carbonaro et al. (2000), que verificaram que as globulinas extraídas de feijão comum cru exibiram bandas de massas moleculares 46, 49 e 50,5 kDa, típicas da faseolina. Em feijão fava, de forma semelhante, a fração vicilina apresenta 5 bandas, cujos pesos moleculares são 50, 35, 31, 19 e 14 kDa (KONSINSKA et al., 2011).

Na Figura 2, nota-se que as bandas da região de 50 kDa aparecem menos intensas. Isso ocorre devido à complexação entre faseolinas e polifenóis brutos dos feijões branco, marrom

e preto crus. Sabe-se que essa ligação aumenta o tamanho da molécula, retardando sua corrida no gel e, portanto, dificultando o surgimento das bandas de maior peso molecular.

Figura 2 - Eletroforese SDS-PAGE 10% corado com coomassie brilliant blue, para verificação do perfil eletroforético da mistura faseolina-polifenóis brutos de feijões crus. G – faseolina da linhagem G2358-fenóis; C – faseolina da cultivar BRS9435-Cometa-fenóis; X – faseolina da cultivar Xamego-fenóis; P – padrão de proteína

Na Figura 3 apresenta-se o perfil eletroforético da mistura de proteínas do feijão branco cru e frações de polifenóis. Sob comportamento semelhante ao mostrado na Figura 2, quando há complexação, as bandas na região de 50 kDa ficam menos evidentes. Percebe-se, ainda, que o perfil da corrida é similar para todas as frações, indicando que as interações entre a faseolina e as frações de polifenóis alteram esta proteína de forma semelhante.

Figura 3 - Eletroforese SDS-PAGE 10% corado com coomassie brilliant blue, para verificação do perfil eletroforético da mistura de faseolina da linhagem G2358 cru com suas frações de polifenóis. FB – faseolina-fração B; FC – faseolina-fração C; FD – faseolina-fração D; FE – faseolina-fração E; FF – faseolina-fração F; P – padrão de proteína

É ainda mais evidente o efeito da complexação em grãos de feijão marrom cru (Figura 4). Neste, as bandas da região de 50 kDa praticamente não aparecem, sobretudo nas frações FC, FD e FE. Este efeito mais intenso da complexação entre faseolina e polifenóis de feijão marrom pode ser devido ao maior teor de compostos fenólicos (capítulo 1) que essa cultivar apresenta em relação aos outros feijões analisados.

Figura 4 - Eletroforese SDS-PAGE 10% corado com coomassie brilliant blue, para verificação do perfil eletroforético da mistura de faseolina da cultivar BRS9435-Cometa cru com suas frações de polifenóis. FB – faseolina-fração B; FC – faseolina-fração C; FD – faseolina-fração D; FE – faseolina-fração E; FF – faseolina-fração F; P – padrão de proteína.

Apresenta-se na Figura 5 o perfil de corrida em eletroforese SDS-PAGE 10% das misturas das frações de polifenóis com as faseolinas pertencentes ao feijão preto cru. Observa-se padrão de corrida semelhante ao dos outros feijões crus; no entanto, para o feijão preto, é perceptível que as frações FB e FC apresentaram distribuição de peptídeos próximo às bandas de 20 e de 50 kDa em proporções muito semelhantes. A menor concentração de peptídeos na região de 50 kDa e maior na de 20 kDa foi mais evidente nas frações FD, FE e FF.

Figura 5 - Eletroforese SDS-PAGE 10% corado com coomassie brilhant blue, para verificação do perfil eletroforético da mistura de faseolina da cultivar Xamego cru com suas frações de polifenóis. FB – faseolina-fração B; FC – faseolina-fração C; FD – faseolina-fração D; FE – faseolina-fração E; FF – faseolina-fração F; P – padrão de proteína

Outra explicação para a distribuição de peptídeos de todas as faseolinas puras e complexadas em bandas próximas de 50 e de 20 kDa é o fato de a região central dessa globulina conter subunidades sensíveis à hidrólise cujos pesos moleculares são 45, 48 e 52 kDa e fragmentos indigeríveis cujos pesos moleculares variam de 22 a 33 kDa (MONTROYA et al., 2010).

Em feijões crus, a ligação das faseolinas com os polifenóis causaram mudanças suaves no perfil eletroforético devido à estrutura compacta das proteínas quando no estado nativo. Em feijões cozidos (Figura 6), no entanto, é notória a alteração do perfil eletroforético em decorrência do processo de desnaturação protéica que ocorre durante a cocção (GENOVESE; LAJOLO, 1998). Esse processo dificulta o deslocamento da proteína, resultando em bandas difusas e que se estendem ao longo de toda a corrida. Por esse motivo, não foi realizada a eletroforese SDS-PAGE para o restante dos grãos cozidos.

Figura 6 - Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com coomassie brilliant blue, para verificação das faseolinas de feijões cozidos sem macerar. G – linhagem G2358; C – cultivar BRS9435-Cometa; X – cultivar Xamego; P – padrão de proteína

4.3.4 Digestibilidade protéica

A digestibilidade das faseolinas de feijões crus variou de 95,67 a 97,66% e a de feijões cozidos de 90,44 a 97,02% (Tabela 3).

Tabela 3 – Digestibilidade (%) das faseolinas de feijão cru, cozido e macerado e cozido

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	97,66 ¹ ± 1,24A ² a ³	95,67 ± 2,01Aa	96,31 ± 1,80Aa
Cozido	96,74 ± 0,50Aa	96,78 ± 1,72Aa	96,05 ± 1,69Aa
Macerado e cozido	90,44 ± 1,43Bb	95,60 ± 0,66Aa	97,02 ± 2,27Aa

¹Médias de três repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Estudos com a faseolina pura de feijão cru caracterizaram-na como resistente à hidrólise in vitro, com 10 a 27% de digestibilidade (MONTROYA et al., 2010). Para faseolinas puras de feijões cozidos, a digestibilidade situa-se entre 57 e 96% (MONTROYA et al., 2008). Genovese e Lajolo (1998) relataram que a digestibilidade da faseolina passou de 22,7% no estado nativo para 88,2% após cozimento. Assim, os resultados obtidos neste estudo para faseolinas de grãos cozidos são confirmados pela literatura e os de faseolinas de feijões crus não.

Observa-se na Tabela 3 que a maceração seguida de cocção somente exerceu influência significativa em grãos brancos e que essa alteração reduziu a digestibilidade da faseolina. Essa redução da digestibilidade provocada pela maceração vai contra os resultados de Nergiz e Gokgoz (2007), que obtiveram aumento de 70,74% de digestibilidade de proteína em feijões crus para 81,27% em feijões macerados e cozidos. A cocção sem maceração não alterou a digestibilidade de forma significativa em nenhum dos feijões analisados e o efeito das cores também não exerceu influência significativa, exceto em feijões brancos macerados e cozidos. Martín-Cabrejas et al. (2009), no entanto, observaram que a digestibilidade de feijão branco passou de 79,1% para 88,6% após cocção e maceração, concluindo assim que a maceração seguida de cocção incrementa a digestibilidade protéica de 7 a 12% e que isso pode ser atribuído à redução ou eliminação de diferentes antinutrientes e ou à flexibilização da molécula de proteína, permitindo o acesso de proteases.

Na Tabela 4 podem ser observados os resultados de digestibilidade dos complexos faseolina-polifenol bruto dos feijões analisados. As maiores digestibilidades foram para os grãos cozidos sem maceração.

Tabela 4 – Digestibilidade (%) das misturas faseolina-polifenol bruto de feijão cru, cozido sem macerar e macerado e cozido

	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Cru	96,93 ¹ ± 1,09B ² a ³	94,57 ± 0,40Bb	97,30 ± 0,51Aa
Cozido	99,59 ± 0,22Aa	99,28 ± 0,30Aa	99,67 ± 0,34Aa
Macerado e cozido	96,73 ± 1,11Ba	99,46 ± 0,20Aa	91,22 ± 1,60Bb

¹Médias de três repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Comparando-se os resultados das Tabelas 3 e 4, nota-se que de modo geral a complexação aumentou o percentual de digestibilidade, o que não era esperado visto que esse fenômeno teoricamente dificulta a hidrólise enzimática de proteínas (REHMAN; SHAH, 2005).

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de digestibilidade dos complexos faseolina-frações de polifenóis dos feijões em questão.

Tabela 5 – Digestibilidade (%) das misturas faseolina-frações de polifenóis de feijão cru, cozido sem macerar e macerado e cozido

Cultivar	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Fração FB			
Cru	99,50 ¹ ± 0,23A ² a ³	90,70 ± 2,46Ab	99,57 ± 0,30Aa
Cozido sem macerar	99,59 ± 0,15Aa	90,81 ± 0,79Ac	96,02 ± 1,61Bb
Cozido macerado	90,53 ± 0,67Bb	92,34 ± 1,06Ab	99,87 ± 0,24Aa
Fração FC			
Cru	99,40 ¹ ± 0,02A ² a ³	99,48 ± 0,17Aa	99,68 ± 0,18Aa
Cozido sem macerar	98,95 ± 0,31Aa	96,05 ± 1,01Bab	95,69 ± 1,96Bb
Cozido macerado	90,65 ± 0,93Bb	99,59 ± 0,22Aa	99,06 ± 0,05Aa
Fração FD			
Cru	99,57 ¹ ± 0,16A ² a ³	92,24 ± 2,01Bb	92,53 ± 1,80Bb
Cozido sem macerar	99,12 ± 0,36Aa	97,49 ± 0,37Ab	99,40 ± 0,33Aa
Cozido macerado	96,71 ± 1,19Bb	99,25 ± 0,14Aa	98,98 ± 0,23Aa
Fração FF			
Cru	99,95 ¹ ± 0,11A ² a ³	95,21 ± 0,78Bb	90,48 ± 1,50Bc
Cozido sem macerar	99,80 ± 0,07Aa	99,49 ± 0,19Ab	99,52 ± 0,01Aab
Cozido macerado	99,41 ± 0,17Ba	99,28 ± 0,22Aa	99,25 ± 0,08Aa

¹Médias de três repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical, para a mesma fração, diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$). FB, FC, FD e FF: frações de polifenóis obtidos por meio de cromatografia em coluna aberta à vácuo.

A análise da Tabela 5 permite inferir que em grãos brancos a maceração seguida de cocção exerceu efeito redutor significativo nas digestibilidades das quatro misturas avaliadas. Entre as cores dos feijões, não foi possível notar comportamento padrão; a digestibilidade ora aumentou ora reduziu nos diferentes complexos e tratamentos analisados. A linhagem branca mostrou-se com melhor digestibilidade em relação aos outros dois feijões, na maioria dos complexos, confirmando a afirmação de Islam et al. (2003) de que geralmente, feijões mais escuros possuem valores de digestibilidade de proteínas menores.

4.4 Conclusão

A ligação entre proteínas e polifenóis de feijão comum provoca alterações nos perfis eletroforéticos das primeiras, indicando a possibilidade de mudanças moleculares estruturais. O efeito da complexação em reduzir a digestibilidade da faseolina isolada foi muito discreto e

muitas vezes inexistente, e o efeito esperado de aumento da digestibilidade pela cocção com ou sem maceração também foi limitado.

Referências

- AHN, J.K.; SEN, L.; WHITAKER, J.R. Stability of tertiary structure of phaseolin of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) as limiting factor in proteolysis. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v.15, p. 263-278, 1991.
- AKESON, W.R.; STAHMANN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, Stoneham, v. 83, p. 257-261, 1964.
- APARICIO-FERNANDEZ, X.; MANZO-BONILLA, L.; LOARCA-PIÑA, G. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, p. 73-78, 2005.
- BARKER, R.D.J.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A.; BOULTER, D. Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, p. 751-757, 1976.
- BONETT, L.P.; BAUMGARTNER, M.S.T.; KLEIN, A.C.; SILVA, L.I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 235-246, set. 2007.
- CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; ALBORES, A.; BAH, M.; CALDERÓN-SALINAS, V.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.; SHIMADA-MIYASAKA, A.; LOARCA-PIÑA, G. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plants Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, p. 161-168, 2006.
- CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 742-749, 2000.
- GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of naturally acid-soluble proteins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on *in vitro* digestibility determination. **Food Chemistry**, Barking, v. 62, n. 3, p. 315-323, 1998.
- HAGERMAN, A.E.; RICE, M.E.; RITCHARD, N.T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin₁₆ (4→8) catechin (procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 2590-2595, 1998.
- ISLAM, F.M.A.; RENGIFO, J.; REDDEN, R.J.; BASFORD, K.E.; BEEBE, S.E. Association between seed coat polyphenolics (Tannins) and disease resistance in common bean. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 58, p. 285-297, 2003.

KOSINSKA, A.; KARAMAC, M.; PENKACIK, K.; URBALEWICZ, A.; AMAROWICZ, R. Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (*Vicia faba* Major) yield soluble and non-soluble complexes. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 233, p. 213-222, 2011.

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

LOPES JÚNIOR, C.O. **Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina**. 2008. 81p. Dissertação (Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MARQUEZ, U.M.L.; LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Easton, v. 29, p. 1068-1074, 1981.

MARQUEZ, U.M.L.; LAJOLO, F.M. In vivo digestibility of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of endogenous protein. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Easton, v. 39, p. 1211-1215, 1991.

MARTÍN-CABREJAS, M.A.; AGUILERA, Y.; PEDROSA, M.M.; CUADRADO, C.; HERNÁNDEZ, T.; DÍAZ, S.; ESTEBAN, R.M. The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. **Food Chemistry**, Barking, v.114, p. 1063-1068, 2009.

MONTOYA, C.A.; LETERME, P.; VICTORIA, N.F.; TORO, O.; SOUFFRANT, W.B.; BEEBE, S.; LALLÈS, J-P. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 2183-2191, 2008.

MONTOYA, C.A.; GOMEZ, A.S.; LALLÈS, J-P.; SOUFFRANT, W.B.; BEEBE, S.; LETERME, P. *In vitro* and *in vivo* protein hydrolysis of beans (*Phaseolus vulgaris*) genetically modified to express different phaseolin types. **Food Chemistry**, Barking, v. 106, p. 1225-1233, 2008b.

MONTOYA, C.A.; LALLÈS, J.P.; BEEBE, S.; LETERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 443-449, 2010.

NACZK, M.; GRANT, S.; ZADERNOWSKI, R.; BARRE, E. Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 96, p. 640-647, 2006.

NERGIZ, C.; GOKGOZ, E. Effects of traditional cooking methods on some antinutrients and *in vitro* protein digestibility of dry bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Turkey. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, p. 868-873, 2007.

PARK, S.J.; KIM, T.W.; BAIK, B-K. Relationship between proportion and composition of albumins, and *in vitro* protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 1719-1725, 2010.

PIRES, C.V. **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro de proteínas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. 2002. 80p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

REHMAN, Z-U.; SHAH, W.H. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, p. 327-331, 2005.

RICHARD, T.; VITRAC, X.; MERILLON, J.M.; MONTI, J.P. Role of peptide primary sequence in polyphenol-protein recognition: an example with neurotensin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1726, p. 238-243, 2005.

SILVA, M.A.; NEVES, V.A.; LOURENÇO, E.J. Frações protéicas e globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), cv IAC-Marrocos. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 12, p. 131-149, 2001.

TAYLOR, M.; CHAPMAN, R.; BEYAERT, R.; HERNÁNDEZ-SEBASTIÀ, C.; MARSOLAIS, F. Seed storage protein deficiency improves sulfur amino acid content in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): redirection of sulfur from γ -glutamyl-S-methyl-cysteine. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 5647-5654, 2008.

TOLEDO, T.C.F.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 355-360, abr/jun. 2008.

5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES DE FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Resumo

Compostos fenólicos existentes naturalmente em feijões são conhecidos por apresentarem atividade antioxidante e esta pode ser parcialmente perdida em alguns processamentos dados a esta leguminosa. Este estudo objetivou avaliar o impacto do processamento térmico e da maceração sobre os perfis e conteúdos de compostos fenólicos e sobre a atividade antioxidante de feijões de três diferentes cores. Foi analisada a atividade antioxidante de extratos de feijão pelos métodos de DPPH e ABTS, e o perfil de ácidos fenólicos e flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para os extratos brutos, os resultados de DPPH variaram de 2,96 a 14,04 mg de TEAC.g⁻¹ de extrato, e os resultados de ABTS situaram-se entre 13,70 e 29,51 mg de TEAC.g⁻¹ de extrato. Em ambos os métodos de avaliação da atividade antioxidante, os resultados foram maiores para a maioria dos extratos das cultivares marrom e preta e os efeitos dos tratamentos foram variáveis. Constatou-se que todos os extratos avaliados possuem os ácidos gálico, clorogênico, vanílico e sinápico, e que os dois primeiros foram os encontrados em maiores teores nos grãos analisados. Praticamente todos os flavonóides analisados foram detectados por CLAE em quase todas as amostras, com exceção do caempferol, que somente foi detectado nas amostras maceradas e cozidas. Para extratos de feijões brancos, os flavonóides encontrados em maiores concentrações foram a catequina e o caempferol-3-rutinosídeo; em extratos de feijões marrons, encontrou-se predominantemente a catequina e o caempferol-3-glicosídeo; e em extratos de feijões pretos, os maiores teores foram encontrados para os flavonóides catequina, caempferol-3-glicosídeo e quercetina-3-glicosídeo. Foi possível concluir que os três tipos de feijão apresentam todos os compostos fenólicos analisados e que, de maneira geral, o efeito do tratamento térmico aumentou a atividade antioxidante, bem como a concentração dos compostos fenólicos avaliados.

Palavras-chave: DPPH; ABTS; Polifenóis

Abstract

Phenolic compounds occurring naturally in beans are known to have antioxidant activity which may be partially lost in some bean processing. This study aimed to evaluate the impact of thermal processing and soaking on the profiles and content of phenolic compounds and the antioxidant activity of three different colored beans. Were analyzed the antioxidant activity of bean extracts by DPPH and ABTS methods, and the profile of phenolic acids and flavonoids by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For crude extracts of the beans, the results of DPPH ranged from 2.96 to 14.04 mg TEAC.g⁻¹ extract, and of ABTS between 13.70 and 29.51 mg TEAC.g⁻¹ extract. In both methods of assessing antioxidant activity, the results were higher for most of the extracts of brown and black cultivars, and treatment effects were variable. It was found for phenolic acids that all extracts evaluated have the gallic acid, chlorogenic, vanillic and sinapic, and the first two were found at higher levels. Almost all flavonoids were detected in almost all samples, except for kaempferol, which was only detected in soaked and cooked samples. For extracts from white beans, flavonoids found in highest concentrations were catechin and kaempferol-3-rutinoside; brown beans extracts showed mostly catechin and kaempferol-3-glucoside, and in extracts of black beans, mainly catechin, kaempferol-3-glucoside and quercetin-3-glucoside. It was concluded that the three types of beans have all phenolic compounds analyzed and, in general, the effect of heat

treatment increased the antioxidant activity and concentration of phenolic compounds evaluated in extracts of beans.

Keywords: DPPH; ABTS; Polyphenols

5.1 Introdução

Os compostos fenólicos predominantes em sementes de leguminosas são os flavonóides, ácidos fenólicos e procianidinas (AMAROWICZ; PEGG, 2008). Trata-se de metabólitos secundários de plantas que possuem propriedades antioxidantes (PRIGENT et al., 2003) relacionadas à estrutura química do polifenol, a qual envolve o número de hidroxilas, grau de glicosilação, entre outros (AGUILERA et al., 2011). Acredita-se que essa propriedade antioxidativa de polifenóis está envolvida na redução de doenças cardiovasculares, diversos tipos de câncer e diabetes mellitus pelo fato de tais compostos sequestrarem radicais livres e espécies reativas de oxigênio, quelarem catalisadores metálicos, ativarem enzimas antioxidantes e inibirem oxidases que podem desencadear doenças degenerativas (MACHADO et al., 2008).

Alguns polifenóis são específicos para determinados alimentos (flavanonas em frutas cítricas, isoflavonas em soja, entre outros), enquanto outros são encontrados em diversas matrizes alimentares. Feijões comuns contêm ácidos fenólicos tais como p-cumárico, vanílico, caféico, ferúlico e sinápico, além de flavonoides como quercetina e caempferol (AMAROWICZ; PEGG, 2008; DINELLI et al., 2006). A quantidade e a composição dos flavonóides glicosilados, taninos condensados (procianidinas) e antocianidinas determinam a cor do tegumento (BENINGER; HOSFIELD, 2003). Grãos pigmentados como o feijão preto possuem maiores teores de compostos fenólicos do que aquelas sementes de cor clara (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007). Geralmente, os alimentos contêm uma mistura complexa de compostos fenólicos, o que dificulta a avaliação de sua biodisponibilidade e atividade biológica devido aos efeitos sinérgicos que essa mistura de compostos pode desencadear (D'ARCHIVIO et al., 2010).

Os processamentos normalmente aplicados em feijões não apenas melhoram seus aspectos sensoriais como também inativam inibidores de tripsina e hemaglutinina, promovem mudanças nas características físicas e na composição química. Feijões são macerados antes da cocção para reduzir o tempo de cocção e também para tornar sua textura mais macia, e o cozimento por meio de pressão pode melhorar a qualidade dessa leguminosa ao melhorar o sabor e a cor, inativar componentes antinutricionais e ativar outros biologicamente ativos (XU; CHANG, 2011). No entanto, tanto a maceração quanto a cocção são conhecidos por

normalmente reduzir os teores de compostos fenólicos naturalmente presentes em feijões crus, levando à redução de sua capacidade antioxidante (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007). Aproximadamente 61% dos flavonóides de feijões crus são perdidos após seu cozimento; 30 a 40% dos polifenóis são eliminados na água de cocção; e entre 75 e 79% desses mesmos compostos são lixiviados na água de maceração quando esta é descartada (XU; CHANG, 2008).

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da maceração seguida de cocção e da cocção sem maceração sobre os perfis e conteúdos de compostos fenólicos e sobre a atividade antioxidante de feijões de três diferentes cores.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Cultivares de feijões e preparo das amostras

Os grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) - Xamego (preto), BRS9435-Cometa (marrom) e G-2358 (branco) - foram doados pela EMBRAPA - Centro de pesquisa Arroz e Feijão, sendo analisados os grãos de feijão cru e após processamento térmico.

Para as análises das amostras cruas, os grãos foram armazenados em temperatura de refrigeração (4°C) até o momento das determinações, quando foram triturados em moinho de facas e peneirados em malha de 30 *mesh* para obter uma amostra homogênea. Os grãos destinados à realização das análises das amostras cozidas foram divididos em dois tratamentos: Tratamento 1- maceração por 10 horas em água destilada, com posterior troca de água e cozimento em autoclave à 121°C por 10 minutos; Tratamento 2- cozimento em autoclave à 121°C por 10 minutos. Após a cocção, as amostras foram liofilizadas até secarem e, posteriormente, armazenadas a -26°C. A moagem dos grãos cozidos foi realizada no momento das análises nas mesmas condições das amostras cruas.

5.2.2 Extração de polifenóis

A extração foi realizada segundo Cardador-Martinez et al. (2006). Para cada 10 gramas de amostra moída foi adicionado 100 mL de metanol, agitando-se durante 24 horas a 70 rpm e 25°C. Após este período as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 812 x g e o sobrenadante formado colocado em balão para evaporar o metanol em rotaevaporador a 35°C com vácuo de -92,1 KPa. Os extratos brutos obtidos foram congelados a -80°C e liofilizados. Foram realizadas cinco extrações para cada amostra.

5.2.3 Fracionamento do extrato bruto de polifenóis

O material obtido na extração foi separado em seis frações utilizando cromatografia em coluna aberta à vácuo, segundo metodologia proposta por Aparício-Fernandez et al. (2005). A quantia de 0,5 g do extrato bruto liofilizado foi diluído em 1 mL de metanol e vertido em coluna aberta com sílica gel (Sigma Aldrich, 13% CaSO_4). Os reagentes foram adicionados (conforme fluxograma abaixo) e as frações coletadas após cada passagem:

- 1- 50 mL de 100% éter de petróleo;
- 2- 50 mL de éter de petróleo:acetato de etila (1:1);
- 3- 50 mL de acetato de etila 100%.

Coleta da Fração A

- 4- 50 mL da mistura: 1 mL de acetato de etila + 49 mL de metanol/água (1:1);
- 5- 50 mL da mistura: 2,5 mL de acetato de etila + 47,5 mL de metanol/água (1:1);
- 6- 50 mL da mistura: 4 mL de acetato de etila + 46 mL de metanol/água (1:1);
- 7- 50 mL da mistura: 6 mL de acetato de etila + 44 mL de metanol/água (1:1);
- 8- 50 mL da mistura: 7,5 mL de acetato de etila + 42,5 mL de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração B

- 9 - 50 mL da mistura: 10 mL de acetato de etila + 40 mL de metanol/água (1:1);
- 10- 50 mL da mistura: 12,5 mL de acetato de etila + 37,5 mL de metanol/água (1:1);
- 11- 50 mL da mistura: 15 mL de acetato de etila + 35 mL de metanol/água (1:1);
- 12- 50 mL da mistura: 17,5 mL de acetato de etila + 32,5 mL de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração C

- 13- 50 mL da mistura: 20 mL de acetato de etila + 30 mL de metanol/água (1:1);
- 14- 50 mL da mistura: 22,5 mL de acetato de etila + 27,5 mL de metanol/água (1:1);
- 15- 50 mL da mistura: 25 mL de acetato de etila + 25 mL de metanol/água (1:1);
- 16- 50 mL da mistura: 30 mL de acetato de etila + 20 mL de metanol/água (1:1);
- 17- 50 mL da mistura: 35 mL de acetato de etila + 15 mL de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração D

- 18- 50 mL da mistura: 40 mL de acetato de etila + 10 mL de metanol/água (1:1);
- 19- 50 mL da mistura: 45 mL de acetato de etila + 5 mL de metanol/água (1:1);
- 20- 50 mL da mistura de metanol/água (1:1).

Coleta da Fração E

- 21- 50 mL de metanol 100%;
- 22- 50 mL de água 100%.

Coleta da fração F

Após a recuperação de cada fração acima, considerando que a fração A foi descartada por se constituir em uma fração de limpeza da coluna, as misturas foram colocadas em balão para evaporar os solventes em rotaevaporador. Os extratos resultantes foram congelados e liofilizados.

5.2.4 Determinação da atividade antioxidante

5.2.4.1 Método DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante, utilizou-se a metodologia proposta por Brand-Williams et al. (1995). Os extratos brutos (2 mg) e frações (6 mg) de polifenóis foram ressuspensos em 1 mL de metanol. Pipetou-se 500 μ L do sobrenadante em tubo de ensaio e adicionou-se 3 mL de etanol e 300 μ L da solução de DPPH. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 45 minutos, no escuro, e as leituras das absorbâncias realizadas a 517 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em miligramas da capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).g⁻¹ de extrato.

5.2.4.2 Método ABTS

Foram utilizados os métodos propostos por Re et al. (1999), Van Den Berg et al. (1999) e Arts et al. (2004) com modificações. O cátion 2,2'-azinobis (3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfônico) (ABTS⁺) foi preparado em frasco âmbar por meio da mistura de 6,62 mg de persulfato de potássio (2,45 mM) e 38,4 mg de ABTS (7 mM) em 10 mL de água deionizada, sendo posteriormente mantido no escuro durante 12 a 16 horas em temperatura de 25°C para liberação dos radicais do ABTS. A solução padrão de Trolox foi elaborada por dissolução de 5 mg de Trolox em 10 mL de etanol. Antes da realização das leituras das amostras, o ABTS⁺ foi diluído em etanol em uma proporção de 1:99, e a absorbância ajustada para $0,700 \pm 0,002$ em espectrofotômetro a 734 nm. Os extratos brutos (10 mg) e frações (14 mg) foram ressuspensos em 1 mL de metanol. Pipetou-se 20 μ L de cada sobrenadante e a estes, foi adicionado 2 mL de solução diluída de ABTS. Foi feita leitura a 734 nm dos tempos zero e 5 minutos. Uma curva padrão foi elaborada utilizando-se concentrações de Trolox de 250 a 2000 μ M, etanol e ABTS, e os resultados expressos em miligramas da capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).g⁻¹ de extrato.

5.2.5 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos

A análise do perfil e conteúdo de ácidos fenólicos livres foi feita por CLAE de acordo com Xu e Chang (2009), com modificações. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu 20A, equipado por um sistema de bombeamento modelo LC-20AT, injetor automático de amostras modelo SIL-20AHT, forno de coluna modelo CTO-20A, comunicador modelo CBM-20A e detector UV (270 e 325nm) modelo SPD-20A. A coluna Zorbax Stablebond Analytical ODS-C18 (Agilent Tecnologia), 4,6 x 250 mm, 5 μm , foi utilizada para a separação a 40 °C, temperatura esta mantida pelo forno da coluna. As fases móveis utilizadas foram A (0,1% de ácido trifluoroacético em solução aquosa) e B (100% de metanol), em gradiente isocrático (20% de fase A e 80% de fase B), e o fluxo igual a 1,0 mL.minuto⁻¹.

Para a identificação dos picos das amostras em CLAE, uma solução estoque (1mg.mL⁻¹) de cada padrão, individualmente, foi preparada e diluída. As soluções diluídas foram injetadas (20 μL), separadamente e em duplicata, nas condições acima descritas e as áreas dos picos formados bem como seus tempos de retenção utilizados para a comparação, quantificação e identificação desses ácidos fenólicos nas amostras posteriormente injetadas.

Para o preparo da solução estoque, 10 mg de cada ácido fenólico foi dissolvido em 10 mL de metanol 80% e então diluídos também em metanol 80% nas séries: 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido vanílico, 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido clorogênico, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido sinápico e 1; 5; 10; 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido gálico. O conteúdo de ácidos fenólicos foi expresso em microgramas por grama de extrato ($\mu\text{g.g}^{-1}$).

5.2.6 Identificação e quantificação de flavonóides

O sistema cromatográfico e metodologia utilizada para a identificação e quantificação de flavonóides foram os mesmos da análise de ácidos fenólicos. A coluna Zorbax Stablebond Analytical ODS-C18 (Agilent Tecnologia), 4,6 x 250 mm, 5 μm , foi utilizada para a separação a 34 °C. As fases móveis utilizadas foram A (0,1% de ácido acético em solução aquosa) e B (0,1% de ácido acético em acetonitrila), nos seguintes gradientes de concentração e fluxos: 1,0 mL.minuto⁻¹, com 15% fase B e 85% fase A durante os primeiros 5 minutos; 1,5 mL.minuto⁻¹, com fase B aumentando até 29% e fase A reduzindo até 71% de 5 a 23 minutos; 1,0 mL.minuto⁻¹, com fase B aumentando até 35% e fase A reduzindo até 65% dos 23 aos 44 minutos; 1,0 mL.minuto⁻¹, aumentando fase B até 50% e reduzindo fase A até 50% dos 44 aos 46 minutos; 1,0 mL.minuto⁻¹, reduzindo fase B até 15% e aumentando fase A até 85% dos 46 aos 48 minutos.

Para a identificação dos picos das amostras em CLAE, uma solução estoque (1mg.mL^{-1}) de cada padrão, individualmente, foi preparada e então diluída. As soluções diluídas foram então injetadas ($20\text{ }\mu\text{L}$), separadamente e em duplicata, nas condições acima descritas e as áreas dos picos formados bem como seus tempos de retenção utilizados para a comparação, quantificação e identificação desses compostos fenólicos nos extratos posteriormente injetados.

Para o preparo da solução estoque, 10 mg de cada flavonóide foi dissolvido em 10 mL de metanol 80% e então diluídos também em metanol 80% nas séries: $5; 10; 25$ e $50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de catequina, $25; 50; 100$ e $250\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de quercetina, $2,5; 5; 10; 25$ e $50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de caempferol-3-glicosídeo, $10; 25; 50$ e $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de caempferol-3-O-rutinosídeo, $10; 25; 50$ e $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de caempferol e $10; 25; 50$ e $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de quercetina-3-glicosídeo. O conteúdo de flavonóides foi expresso em microgramas por grama de extrato ($\mu\text{g.g}^{-1}$).

5.2.7 Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. As análises de atividade antioxidante foram feitas em duplicata, com duas repetições para todos os extratos e frações, e as análises de identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides foram feitas em duplicata, com duas repetições somente para os extratos brutos de polifenóis. Os resultados foram analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade no programa estatístico SISVAR 5.3.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Atividade antioxidante pelo método do DPPH

Na Tabela 1 são apresentados os valores obtidos da atividade antioxidante pelo método DPPH. Para os extratos brutos, os resultados variaram de $2,96$ a $14,04\text{ mg}$ de TEAC. g^{-1} de extrato. Os feijões marrons e pretos diferiram do branco em todos os tratamentos aplicados e tanto a maceração seguida de cocção quanto a cocção sem maceração apresentaram maior atividade antioxidante em relação aos mesmos grãos na forma crua. Tais resultados também foram encontrados no estudo de Rocha-Guzmán et al. (2007), que concluíram que os feijões cozidos apresentaram maior poder de retirada de radicais livres em relação aos crus, independentemente da cor do grão e do teor de compostos fenólicos ter reduzido. Esse aumento do potencial antioxidativo após o tratamento térmico acompanhado ou não de maceração pode ser devido à concentração dos compostos fenólicos no caldo de

cocção (VALDÉS et al., 2011), facilitando a sua extração em relação às sementes cruas. Neste mesmo estudo, as amostras cruas marrons apresentaram maiores valores de atividade antioxidante em relação aos grãos pretos.

Tabela 1 – Atividade antioxidante (mg de TEAC.g⁻¹ de extrato), pelo método DPPH, dos extratos brutos e frações de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido sem macerar e macerado e cozido

Cultivar	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Extratos brutos			
Cru	2,96Cb ± 0,08	8,73Ba ± 0,56	9,99Ba ± 0,36
Cozido	8,46Ab ± 0,64	12,65Aa ± 0,33	14,01Aa ± 0,05
Macerado e cozido	6,44Bb ± 0,03	13,74Aa ± 0,13	14,04Aa ± 0,18
Fração FB			
Cru	0,38Bb ± 0,23	4,48Ba ± 0,54	6,05Aa ± 0,69
Cozido	2,29Ab ± 0,46	7,13Aa ± 0,12	6,22Aa ± 0,15
Macerado e cozido	1,38Abc ± 0,05	4,82Ba ± 0,16	3,96Bb ± 0,28
Fração FC			
Cru	0,96Bb ± 0,46	6,05Aa ± 0,26	5,15Ba ± 0,09
Cozido	1,20ABb ± 0,07	6,25Aa ± 0,99	7,06Aa ± 0,16
Macerado e cozido	2,40Ac ± 0,20	7,26Aa ± 0,15	5,53Bb ± 0,04
Fração FD			
Cru	0,61Ba ± 0,09	4,48Aa ± 3,25	1,42Ba ± 0,43
Cozido	6,69Aa ± 1,09	3,28Aa ± 1,32	2,86Aa ± 0,05
Macerado e cozido	1,50Bc ± 0,15	3,41Aa ± 0,08	2,88Ab ± 0,08
Fração FF			
Cru	2,17Aa ± 0,05	0,53Ab ± 0,31	0,39Bb ± 0,17
Cozido	2,36Aa ± 1,20	0,87Aa ± 0,27	1,81Aa ± 0,01
Macerado e cozido	1,63Aa ± 0,22	1,37Aa ± 0,12	1,73Aa ± 0,31

¹Médias de duas repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical, para a mesma fração, diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$). FB, FC, FD e FF: frações de polifenóis obtidos por meio de cromatografia em coluna aberta à vácuo.

Com relação à atividade antioxidante medida pelo método DPPH das frações, de maneira geral, essa propriedade foi maior nas duas cultivares pigmentadas em todas as frações e em todos os tratamentos aplicados. Exceção a isso ocorreu na fração FF cru, na qual o grão branco apresentou maior atividade antioxidante. A cocção acompanhada ou não de

maceração, para a maioria das frações, resultou em maior atividade antioxidante em relação aos extratos de feijões crus. Esse resultado de aumento da atividade antioxidante proporcionado pelo processo de maceração foi contrário ao encontrado no estudo de Ranilla et al. (2009).

No trabalho de Xu e Chang (2008), a capacidade de sequestro de radicais livres medida pelo método DPPH foi reduzida em 28 a 36% em grãos cozidos sob pressão em relação aos grãos crus e reduzida em 23 a 31% quando comparado aos grãos macerados antes da cocção. Os autores atribuíram à redução da atividade antioxidante a solubilização dos antioxidantes solúveis na água de maceração descartada e o próprio efeito da temperatura.

Os valores de atividade antioxidante deste estudo variaram muito (0,38 a 7,26 mg de TEAC.g⁻¹ de extrato) de uma fração para a outra, de um tratamento para o outro, de uma coloração de grão para a outra, e foram menores do que os encontrados para os extratos brutos.

5.3.2 Atividade antioxidante pelo método do ABTS

Os resultados da atividade antioxidante medida pelo método ABTS são apresentados na Tabela 2. Nela pode ser constatado que, para extratos brutos, os resultados situaram-se entre 13,70 e 29,51 mg de TEAC.g⁻¹ de extrato. As maiores atividades foram observadas para a cultivar marrom em todos os tratamentos, confirmando os resultados do capítulo 1, no qual foi avaliada a atividade antioxidante dos grãos íntegros de feijão, e os resultados de Beninger e Hosfield (2003), que encontraram maior atividade de inibição da peroxidação lipídica por meio de ensaio de imunofluorescência para feijões marrons. No estudo de Madhujith e Shahidi (2005), foram avaliadas as atividades antioxidantes utilizando ABTS para extratos em acetona de cascas e de grãos inteiros de quatro tipos de feijões. Esses autores obtiveram maiores resultados para os extratos das cascas (40,74 a 46,69 vezes mais efetivo que o Trolox) em relação às atividades antioxidantes mostradas pelos extratos de grãos inteiros (4,64 a 8,84 vezes mais efetivo que o Trolox). Concluíram, ainda, que a atividade antioxidante foi maior para extratos de grãos vermelhos, seguido de grãos marrons, pretos e brancos, fato esse que confirma os resultados obtidos no presente estudo.

Pelo método ABTS, os extratos de feijões crus não mais apresentaram as menores atividades antioxidantes, porém para a linhagem branca também não houve diferença significativa da forma crua com as cozidas maceradas ou sem macerar.

Tabela 2 – Atividade antioxidante (mg de TEAC.g⁻¹ de extrato), pelo método ABTS, dos extratos brutos e frações de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido

Cultivar	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Extratos brutos			
Cru	14,92Ab ± 0,45	22,30Aba ± 2,28	19,50Aab ± 3,07
Cozido	13,70Ab ± 1,14	29,51Aa ± 4,64	13,94Bb ± 0,26
Macerado e cozido	15,04Ab ± 0,62	20,28Ba ± 0,87	21,10Aa ± 0,12
Fração FB			
Cru	8,88Aa ± 1,31	34,96Aa ± 21,20	33,78Aa ± 8,15
Cozido	0,73Bc ± 0,03	11,57Aa ± 0,14	5,57Bb ± 1,44
Macerado e cozido	9,83Ab ± 0,53	20,96Aa ± 0,75	13,72ABb ± 1,38
Fração FC			
Cru	11,59Ab ± 1,55	46,70Aa ± 3,14	35,67Aa ± 6,33
Cozido	11,53Ab ± 0,56	29,31Ba ± 2,26	35,65Aa ± 1,88
Macerado e cozido	11,12Ab ± 0,09	19,72Ba ± 1,79	21,17Aa ± 1,03
Fração FD			
Cru	8,60Bb ± 0,78	20,15Aa ± 0,54	11,08Ab ± 0,46
Cozido	70,18Aa ± 0,08	13,06Bb ± 0,21	11,43Ab ± 1,72
Macerado e cozido	9,55Ba ± 0,14	11,42Ba ± 0,99	9,40Aa ± 0,36
Fração FF			
Cru	14,72Aa ± 1,01	13,48Aa ± 1,09	13,07Aa ± 4,88
Cozido	16,6Aa ± 0,07	15,57Aa ± 1,56	13,13Aa ± 1,47
Macerado e cozido	8,69Ba ± 0,07	10,92Aa ± 2,54	13,40Aa ± 1,71

¹Médias de duas repetições ± desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical, para a mesma fração, diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$). FB, FC, FD e FF: frações de polifenóis obtidos por meio de cromatografia em coluna aberta à vácuo.

No tocante às frações, novamente as duas cultivares apresentaram na maioria dos tratamentos e frações as maiores atividades antioxidantes. O maior e o menor resultado das frações de extrato bruto foram 70,18 e 0,73 mg de TEAC.g⁻¹ de extrato, respectivamente para as frações FB e FD de feijão branco. Assim como para os extratos brutos, as frações de feijões crus não mais apresentaram os menores resultados. Nas frações FC e FD de feijão marrom, a cocção precedida ou não de maceração promoveu queda da atividade antioxidante em relação

ao extrato do mesmo grão cru, enquanto que nas outras frações em seus diferentes tratamentos não houve desempenho padrão quanto à propensão de sequestrar radicais livres.

A queda da atividade antioxidante após o tratamento térmico de algumas cultivares em algumas frações justifica-se em parte à possibilidade de ocorrerem transformações químicas, decomposição de compostos fenólicos e formação de complexos entre polifenóis e proteínas (XU; CHANG, 2008).

De modo geral, os extratos brutos apresentaram atividade antioxidante semelhante em relação às suas respectivas frações. O mesmo achado é mostrado no estudo de Beninger e Hosfield (2003), que justificam tais resultados no fato dos flavonoides presentes no extrato bruto estarem concentrados ainda mais nas frações desse extrato e serem os principais responsáveis pela atividade antioxidante desempenhada.

5.3.3 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos

Os teores de ácidos fenólicos presentes nos extratos brutos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Ácidos fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de extrato) dos extratos brutos de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido

Cultivar	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Ácido Vanílico			
Cru	377,49Cc $\pm$ 3,34	498,17Cb $\pm$ 2,01	913,45Ba $\pm$ 1,76
Cozido	510,17Bc $\pm$ 1,22	779,83Ab $\pm$ 21,42	1404,45Aa $\pm$ 21,42
Macerado e cozido	586,24Ab $\pm$ 2,42	563,97Bc $\pm$ 1,62	718,19Ca $\pm$ 3,79
Ácido Gálico			
Cru	2602,01Bc $\pm$ 5,16	2872,37Cb $\pm$ 5,46	3130,67Ba $\pm$ 2,90
Cozido	2203,55Cc $\pm$ 4,89	3693,39Aa $\pm$ 44,22	3471,89Ab $\pm$ 45,29
Macerado e cozido	2938,24Ab $\pm$ 17,09	3510,18Ba $\pm$ 59,51	2293,76Cc $\pm$ 29,45
Ácido Clorogênico			
Cru	3782,56Ab $\pm$ 81,44	3139,81Ac $\pm$ 6,28	4430,26Aa $\pm$ 0,35
Cozido	1642,72Cc $\pm$ 3,28	1812,56Ba $\pm$ 2,83	1753,92Bb $\pm$ 6,67
Macerado e cozido	2117,31Ba $\pm$ 0,73	1552,49Cb $\pm$ 5,30	1272,04Cc $\pm$ 1,62
Ácido Sinápico			
Cru	145,84Ca $\pm$ 2,70	140,19Ca $\pm$ 8,27	88,52Cb $\pm$ 0,41
Cozido	382,37Aa $\pm$ 0,54	258,71Ac $\pm$ 3,91	289,60Ab $\pm$ 1,58
Macerado e cozido	326,32Ba $\pm$ 1,90	194,17Bb $\pm$ 1,22	196,68Bb $\pm$ 1,08

¹Médias de duas repetições $\pm$ desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical, para a mesma fração, diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Em todas as amostras foram encontrados os ácidos fenólicos analisados, sendo que os maiores teores foram de ácido gálico e clorogênico. Estes ácidos são relatados na literatura por existirem em feijões, porém não em quantidades elevadas como as encontradas aqui. Xu e Chang (2009) encontraram 89,64 e 32,93 μg de ácido gálico. g^{-1} de feijão preto cru e cozido sob pressão durante 10 minutos, respectivamente, e 226,1 e 89,9 μg de ácido clorogênico. g^{-1} de feijão preto cru e cozido sob pressão durante 10 minutos, respectivamente. No entanto, Luthria e Pastor-Corrales (2006) avaliaram 15 tipos de feijões e detectaram apenas os ácidos p-cumárico, sinápico e ferúlico, apresentando este último a maior concentração. Ranilla et al. (2007) detectaram ácido clorogênico em apenas três das vinte e oito cultivares analisadas e, ainda assim, em quantidades muito inferiores (entre 2,8 e 5,6 $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) às aqui encontradas. A partir do exposto, é necessário ressaltar que os resultados encontrados neste estudo podem ter sido muito superiores aos da literatura consultada devido ao fato de aqui terem sido avaliados tais compostos em extratos e não nos grãos íntegros, como a maioria dos trabalhos citados.

Cada ácido fenólico foi encontrado em maior quantidade em um feijão específico, indicando que a cor da semente é diretamente influenciada por sua composição de ácidos fenólicos. Além do genótipo, práticas agrícolas, condições climáticas, maturidade na colheita, entre outros aspectos influenciarem o perfil de compostos fenólicos desta leguminosa (VALDÉS et al., 2011).

Para o ácido vanílico, observa-se maior concentração na cultivar preta em relação às outras cores de feijão, sendo o maior resultado encontrado nessa cultivar cozida sem maceração. Observa-se ainda que a cocção aumenta significativamente a concentração de tal ácido em todos os grãos. Contrariamente ao exposto, Diaz-Batalla et al. (2006) encontraram menores teores de ácido vanílico nos grãos cozidos em relação aos crus para os 14 feijões analisados, embora este estudo confirme que os maiores resultados foram encontrados em feijão preto, com 14,1 e 11,5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ para feijões crus e cozidos, respectivamente. Aguilera et al. (2011) não detectaram ácido vanílico em feijões cozidos macerados ou sem macerar e encontraram 10,71 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ em feijões crus.

Quanto ao ácido gálico, as maiores concentrações foram encontradas nas cultivares BRS9435-Cometa e Xamego, sendo o maior valor encontrado para a primeira na forma cozida sem macerar. Conclui-se ainda que as maiores concentrações desse ácido fenólico são encontradas nos extratos de feijões cozidos. Xu e Chang (2009), no entanto, obtiveram resultados iguais a 83,17 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ em feijões crus e 38,16 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ em feijões cozidos marrons,

resultados estes muito inferiores aos aqui apresentados e também contrários no tocante ao efeito da cocção sobre o teor desse ácido fenólico.

O ácido clorogênico apresentou-se em maiores quantidades nos extratos de feijões crus, sobretudo na cultivar preta. No trabalho de Ranilla et al. (2007), entretanto, os maiores resultados obtidos foram para cultivares marrom e branca.

No tocante ao ácido sinápico, os maiores teores foram encontrados nos extratos de grãos cozidos sem maceração. Os extratos macerados e cozidos seguiram com resultados intermediários e os extratos de feijões crus apresentaram os mais baixos valores de ácido sinápico. Em todos os tratamentos, a linhagem de feijão branco mostrou as maiores concentrações, diferindo das duas cultivares analisadas. No estudo de Espinosa-Alonso et al. (2006) foram encontradas concentrações de ácido sinápico variando entre 4,04 e 22,4 mg.Kg⁻¹ de feijão claro e de mistura de cores, respectivamente.

Na Tabela 4 estão os resultados de ácidos fenólicos das frações de extratos brutos. Foram analisadas as duas frações que obtiveram as maiores atividades antioxidantes pelo método DPPH e ABTS, sendo essas frações variáveis de acordo com o feijão e tratamento dado. Por esse motivo, foi realizado teste de médias das duplicatas de injeções no cromatógrafo.

Tabela 4 – Ácidos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato) das frações de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido

Cultivar	G-2358			BRS9435-Cometa			Xamego		
	FB	FC	FF	FB	FC	FF	FB	FC	FF
Ácido Vanílico									
Cru	-	83,33a $\pm 0,47$	41,48b $\pm 26,57$	783,74a $\pm 2,09$	768,06a $\pm 0,84$	-	1261,99a $\pm 6,10$	840,44a $\pm 8,78$	-
Cozido	-	238,88a $\pm 5,03$	30,75a $\pm 4,60$	-	628,71a $\pm 0,82$	69,18a $\pm 2,68$	-	1906,57a $\pm 45,88$	120,79a $\pm 6,92$
Macerado e cozido	677,76a $\pm 0,24$	442,83a $\pm 1,85$	-	1136,23a $\pm 8,69$	688,81a $\pm 18,27$	-	-	774,93a $\pm 8,81$	60,35a $\pm 4,13$
Ácido Gálico									
Cru	-	916,61b $\pm 1,98$	1881,15a $\pm 245,80$	3494,27a $\pm 3,76$	4530,60a $\pm 6,73$	-	3484,32a $\pm 23,48$	2899,06a $\pm 2,21$	-
Cozido	-	995,59 $\pm 11,48$	nd	-	3100,71 $\pm 1,73$	nd	-	4294,82a $\pm 54,48$	25,14a $\pm 3,22$
Macerado e cozido	3688,13a $\pm 27,55$	2829,65a $\pm 1,20$	-	6475,18a $\pm 76,83$	4766,28a $\pm 42,64$	-	-	2273,71 $\pm 11,07$	nd

(Continua)

Tabela 4 – Ácidos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato) das frações de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido (Continuação)

Cultivar	G-2358			BRS9435-Cometa			Xamego		
	FB	FC	FF	FB	FC	FF	FB	FC	FF
Ácido Clorogênico									
Cru	-	1155,27b $\pm 1,50$	1620,58a $\pm 47,18$	1595,09a $\pm 0,25$	2833,63a $\pm 3,40$	-	2324,40a $\pm 7,39$	2869,47a $\pm 0,47$	-
Cozido	-	719,85a $\pm 1,20$	72,05a $\pm 0,86$	-	1325,83 $\pm 2,14$	nd	-	2368,47a $\pm 0,00$	254,33b $\pm 1,12$
Macerado e cozido	1398,16a $\pm 1,46$	1366,44a $\pm 1,60$	-	2050,96a $\pm 1,20$	1994,51a $\pm 4,56$	-	-	1282,69a $\pm 1,35$	135,89a $\pm 1,62$
Ácido Sinápico									
Cru	-	78,67a $\pm 0,18$	53,54a $\pm 2,11$	173,40a $\pm 2,09$	195,73a $\pm 2,57$	-	125,72a $\pm 0,40$	75,68a $\pm 0,23$	-
Cozido	-	149,53a $\pm 0,55$	47,48a $\pm 0,07$	-	148,87a $\pm 0,50$	47,12a $\pm 0,36$	-	290,87a $\pm 4,91$	47,26b $\pm 0,13$
Macerado e cozido	500,72a $\pm 5,00$	310,24a $\pm 0,24$	-	346,12a $\pm 18,14$	155,61a $\pm 6,37$	-	-	93,23a $\pm 0,07$	53,05a $\pm 0,19$

¹Médias de duas repetições $\pm$ desvio padrão. Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal, para a mesma amostra, diferem significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de média. FB, FC e FF: frações de polifenóis obtidos por meio de cromatografia em coluna aberta à vácuo que apresentaram maiores atividades antioxidantes. Foram utilizadas duas frações para cada feijão e tratamento. nd – não detectado.

Observa-se que alguns ácidos fenólicos não estavam presentes em ambas as frações avaliadas. Disso permite-se extrapolar que a expressiva atividade antioxidante das frações que não apresentam determinado ácido fenólico não é decorrente da presença desse composto fenólico específico, mas de outros também presentes no extrato avaliado.

As maiores concentrações de ácidos fenólicos encontradas foram para o ácido gálico e o clorogênico. Entre as frações avaliadas para os diferentes compostos fenólicos, geralmente a FB e a FC tiveram resultados mais altos em relação à FF, embora muitos não tenham diferido significativamente. Esse fato decorre da polaridade dos ácidos avaliados e dos solventes utilizados no fracionamento. Sabe-se que os ácidos fenólicos quantificados aqui são caracteristicamente polares (SOARES, 2002).

A literatura relata que os ácidos clorogênico, sinápico e gálico possuem elevadas atividades antioxidantes, embora o ácido vanílico tenha atividade mais discreta (YEH; YEN, 2003; SOARES, 2002; AABY et al., 2004). Assim, conclui-se que as frações dos extratos de feijões aqui avaliados, por conterem maiores quantidades dos ácidos clorogênico e gálico, apresentam elevado potencial como antioxidantes, confirmando os resultados da atividade antioxidante medida pelos métodos DPPH e ABTS.

5.3.4 Identificação e quantificação de flavonóides

Na Tabela 5 encontram-se os resultados de flavonóides dos extratos brutos de polifenóis dos feijões analisados. A maior parte dos flavonóides analisados foram detectados em quase todas as amostras, com exceção do caempferol, que só foi detectado nas amostras maceradas e cozidas. Todavia, no estudo de Díaz-Batalla et al. (2006), o caempferol esteve presente em maiores concentrações nos feijões crus (média de $52,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ de feijão) em relação aos cozidos (média de $27,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ de feijão), assim como no trabalho de Amarowicz e Pegg (2008), no qual a cocção promoveu redução desse composto de 5 a 71%. Romani et al. (2004), ao avaliarem os teores de alguns flavonóides em feijões italianos, não identificaram ou obtiveram em quantidades-traço a quercetina-3-glicosídeo; o que somente ocorreu em extratos de feijões brancos cozidos sem maceração neste estudo. Não obstante, a distribuição desses compostos nos extratos metanólicos foi bastante variável dependendo da cor da casca dos feijões e também dos tratamentos aplicados. Essa variação de resultados pode ser atribuída também à influência que diferentes fatores tais como luz, temperatura, grau de nutrição da planta, exposição à patógenos, entre outros podem exercer no conteúdo desses compostos fenólicos (DINELLI et al., 2006).

Para extratos de feijões brancos, os flavonóides encontrados em maiores concentrações foram a catequina e o caempferol-3-rutinosídeo; em extratos de feijões marrons, encontrou-se predominantemente a catequina e o caempferol-3-glicosídeo; e em extratos de feijões pretos, os maiores teores foram encontrados para os flavonóides catequina, caempferol-3-glicosídeo e quercetina-3-glicosídeo. Constata-se, portanto, que a maior pigmentação dos grãos está diretamente relacionada à presença de flavonóides na forma glicosilada. Ranilla et al. (2007) detectaram quercetina e caempferol em feijões marrons, caempferol em feijões brancos, e quercetina e caempferol em feijões pretos. Lin et al. (2008) encontraram miricetina-3-glicosídeo, quercetina-3-glicosídeo e caempferol-3-glicosídeo em feijões pretos, e caempferol-3-glicosídeo em feijões marrons.

Tabela 5 – Flavonóides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato) dos extratos brutos de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido

Cultivar	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Caempferol			
Cru	0,00Ba $\pm$ 0,00	0,00Ba $\pm$ 0,00	0,00Ba
Cozido	0,00Ba $\pm$ 0,00	0,00Ba $\pm$ 0,00	0,00Ba $\pm$ 0,00
Macerado e cozido	311,20Aa $\pm$ 23,67	127,41Ab $\pm$ 10,29	128,78Ab $\pm$ 17,17
Caempferol-3-glicosídeo			
Cru	9,20Ac $\pm$ 2,74	1098,62Ba $\pm$ 37,57	167,51Bb $\pm$ 18,31
Cozido	24,87Ac $\pm$ 22,80	1690,77Aa $\pm$ 16,71	307,60Ab $\pm$ 20,00
Macerado e cozido	10,68Ac $\pm$ 6,30	1136,59Ba $\pm$ 24,50	117,63Bb $\pm$ 0,06
Caempferol-3-rutinosídeo			
Cru	72,27Cb $\pm$ 1,68	13,62Cc $\pm$ 0,83	121,52Aa $\pm$ 14,07
Cozido	178,49Ba $\pm$ 40,82	69,78Bb $\pm$ 13,41	83,52Aab $\pm$ 8,54
Macerado e cozido	327,68Aa $\pm$ 2,25	176,81Ab $\pm$ 1,36	93,80Ac $\pm$ 5,82
Catequina			
Cru	298,39Bb $\pm$ 0,15	1105,77Ba $\pm$ 112,37	263,99Cb $\pm$ 42,15
Cozido	185,61Bc $\pm$ 88,68	1886,61Aa $\pm$ 73,03	986,12Ab $\pm$ 32,02
Macerado e cozido	547,33Ab $\pm$ 23,04	1428,83Ba $\pm$ 36,50	586,44Bb $\pm$ 8,87
Quercetina			
Cru	14,58Aa $\pm$ 3,75	9,58Aa $\pm$ 2,03	4,82Aa $\pm$ 6,82

(Continua)

Tabela 5 – Flavonóides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato) dos extratos brutos de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido (Continuação)

Cultivar	G-2358	BRS9435-Cometa	Xamego
Quercetina			
Cozido	16,08Aa $\pm$ 0,64	10,67Aa $\pm$ 4,03	11,73Aa $\pm$ 0,97
Macerado e cozido	35,77Aa $\pm$ 9,24	12,14Ab $\pm$ 1,22	13,74Aab $\pm$ 0,68
Quercetina-3-glicosídeo			
Cru	2,66Bb $\pm$ 3,77	23,07Ab $\pm$ 5,54	169,95Ba $\pm$ 21,74
Cozido	0,00Bb $\pm$ 0,00	33,70Ab $\pm$ 9,58	343,65Aa $\pm$ 26,04
Macerado e cozido	66,32Ab $\pm$ 6,45	12,81Ac $\pm$ 5,44	135,59Ba $\pm$ 3,10

¹Médias de duas repetições $\pm$ desvio padrão; ²Médias com letras maiúscula(s) diferente(s) na vertical, para a mesma fração, diferem significativamente ($p \leq 0,05$); ³Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

As maiores concentrações de catequina foram encontradas em extratos de grãos com maior pigmentação, o que era esperado, visto que a catequina é um tipo procianidina e este é o principal grupo de flavonóide presente em feijão (KOSINSKA et al., 2011). No entanto, Xu e Chang (2009) não detectaram esse flavonóide em feijões marrom cru e cozido.

A partir da análise da Tabela 5, observa-se para todos os flavonóides que, quando há diferença significativa entre os extratos na forma crua e na forma cozida, os primeiros sempre apresentam resultados inferiores. O efeito da maceração é variável para cada extrato e composto avaliados, sendo nítido, entretanto, seu efeito de aumento das concentrações de caempferol e caempferol-3-rutinosídeo. Esses resultados vão contra os relatos da literatura, que afirmam que a cocção e a maceração desempenham impactos negativos nas concentrações de flavonóides (AGUILERA et al., 2011; DÍAZ-BATALLA et al., 2006; XU; CHANG, 2009).

Nota-se ainda que a quercetina não sofreu influência da cocção, acompanhada ou não de maceração. Amarowicz e Pegg (2008), entretanto, encontraram redução de 12 a 65% nas concentrações desse flavonóide após a cocção de feijões, assim como Díaz-Batalla et al. (2006), que encontraram médias de 10,9 μg de quercetina. g^{-1} de feijão cru e 6,5 μg de quercetina. g^{-1} de feijão cozido.

Os resultados de flavonóides para as frações dos extratos brutos de feijões são apresentados na Tabela 6. Percebe-se que muitas frações não apresentaram alguns dos compostos fenólicos analisados e que o comportamento do caempferol foi semelhante ao apresentado nos extratos brutos de polifenóis, mostrando-se presente somente nos extratos de feijões macerados e cozidos.

Aparicio-Fernandez et al. (2005), os quais realizaram fracionamento de extratos metanólicos de feijão preto, assim como o realizado neste estudo, detectaram caempferol-3-glicosídeo, quercetina-3-glicosídeo e miricetina glicosilada apenas na fração FB, na proporção de 5,8; 4,1 e 6,7 respectivamente. Esses autores ressaltam que a ocorrência de miricetina glicosilada em feijões não era esperada, sendo raramente documentada nessa leguminosa.

Tabela 6 – Flavonóides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato) das frações de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido

Cultivar	G-2358			BRS9435-Cometa			Xamego		
	FB	FC	FF	FB	FC	FF	FB	FC	FF
Caempferol									
Cru	-	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	-
Cozido	-	0,00	0,00	-	0,00	0,00	-	0,00	0,00
Macerado e cozido	561,20a $\pm 0,48$	304,64b $\pm 21,20$	-	427,50a $\pm 0,41$	173,61a $\pm 5,35$	-	-	52,84 $\pm 1,73$	0,00
Caempferol-3-glicosídeo									
Cru	-	nd	nd	1564,37a $\pm 0,35$	1888,64a $\pm 1,65$	-	181,69a $\pm 0,40$	154,02b $\pm 12,87$	-
Cozido	-	nd	5,31 $\pm 0,27$	-	1416,16 $\pm 4,56$	nd	-	409,31 $\pm 3,34$	nd
Macerado e cozido	16,08a $\pm 1,65$	37,60a $\pm 2,23$	-	1813,33a $\pm 15,25$	1269,96a $\pm 22,53$	-	-	111,70a $\pm 2,45$	9,78a $\pm 0,72$
Caempferol-3-rutinosídeo									
Cru	-	7,23a $\pm 0,47$	15,86a $\pm 1,43$	18,33a $\pm 0,02$	19,78a $\pm 0,06$	-	122,67a $\pm 0,67$	95,04a $\pm 0,13$	-
Cozido	-	116,08a $\pm 1,65$	30,78a $\pm 0,25$	-	71,17 $\pm 2,97$	nd	-	nd	nd

(Continua)

Tabela 6 – Flavonóides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato) das frações de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido
(Continuação)

Cultivar	G-2358			BRS9435-Cometa			Xamego		
	FB	FC	FF	FB	FC	FF	FB	FC	FF
Caempferol-3-rutinosídeo									
Macerado e cozido	nd	nd	-	8,40 $\pm 1,29$	nd	-	-	nd	nd
Catequina									
Cru	-	125,52a $\pm 0,25$	44,02b $\pm 7,06$	1057,41a $\pm 1,43$	1594,51a $\pm 3,96$	-	172,82a $\pm 6,02$	132,82a $\pm 0,68$	-
Cozido	-	46,17a $\pm 1,60$	7,90a $\pm 1,98$	-	1501,24a $\pm 168,31$	44,27b $\pm 0,37$	-	1136,01a $\pm 11,66$	29,68b $\pm 0,15$
Macerado e cozido	657,39a $\pm 7,06$	87,49a $\pm 0,66$	-	1097,99a $\pm 3,03$	1466,67a $\pm 4,22$	-	-	294,59a $\pm 2,34$	89,38a $\pm 0,49$
Quercetina									
Cru	-	nd	9,16 $\pm 0,32$	8,19b $\pm 0,04$	12,49a $\pm 6,72$	-	12,23a $\pm 1,67$	7,50a $\pm 1,20$	-
Cozido	-	16,35 $\pm 9,66$	nd	-	nd	10,76 $\pm 0,40$	-	16,77 $\pm 1,14$	nd

(Continua)

Tabela 6 – Flavonóides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato) das frações de polifenóis de feijão branco, marrom e preto cru, cozido e macerado e cozido**(Conclusão)**

Cultivar	G-2358			BRS9435-Cometa			Xamego		
	FB	FC	FF	FB	FC	FF	FB	FC	FF
Quercetina									
Macerado e cozido	67,28a $\pm 0,75$	29,23a $\pm 2,37$	- -	15,40 $\pm 0,64$	nd	-	-	14,62 $\pm 0,27$	nd
Quercetina-3-glicosídeo									
Cru	-	nd	6,13 $\pm 0,20$	9,46a $\pm 0,44$	7,55a $\pm 0,20$	-	154,11a $\pm 25,58$	126,55b $\pm 0,75$	-
Cozido	-	nd	nd	-	20,39 $\pm 0,06$	nd	-	314,38a $\pm 6,03$	35,72b $\pm 0,07$
Macerado e cozido	nd	nd	-	16,48a $\pm 0,93$	19,28a $\pm 2,65$	-	-	76,65a $\pm 0,15$	15,35a $\pm 0,52$

¹Médias de duas repetições $\pm$ desvio padrão. Médias com letras minúscula(s) diferente(s) na horizontal, para a mesma amostra, diferem significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de média. FB, FC e FF: frações de polifenóis obtidos por meio de cromatografia em coluna aberta à vácuo que apresentaram maiores atividades antioxidantes. Foram utilizadas duas frações para cada feijão e tratamento. nd – não detectado.

Constata-se que a catequina é o único flavonóide encontrado em todas as frações de extratos analisados e a explicação repete-se no fato de esse composto pertencer ao grupo procianidina, presente em praticamente todos os feijões. No trabalho realizado por Aguilera et al. (2011), as concentrações de catequina obtidas para feijão branco cru e cozido com maceração foram $142,58 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $76,25 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, resultados estes muito semelhantes aos obtidos neste estudo (Tabela 6).

Praticamente todos os flavonóides analisados apresentaram menores concentrações na fração FF em relação à outra fração analisada para o mesmo tratamento e cor de feijão. Essa observação permite concluir que a maioria desses compostos fenólicos não são extraídos ou são em pequenas quantidades pelo solvente dessa fração. Apesar de Arabbi et al. (2004), Lin e Tang (2007), e Beninger e Hosflied (2003) indicarem que flavonóides encontram-se sobretudo na forma glicosilada, as frações avaliadas apresentaram também os flavonóides na forma aglicona.

Assim como para ácidos fenólicos, os resultados encontrados neste estudo para flavonóides podem ter sido muito superiores aos da literatura consultada devido ao fato de aqui terem sido avaliados tais compostos em extratos e não nos grãos íntegros, como a maioria dos trabalhos citados.

5.4 Conclusão

Extrapolando os resultados obtidos para flavonóides e ácidos fenólicos em todos os extratos e frações para os grãos de feijão em questão, conclui-se que os três tipos de feijão apresentam todos os compostos fenólicos analisados, sendo necessário ou não a aplicação de calor para que esses compostos se tornem ativos.

De maneira geral, o efeito do tratamento térmico aumentou a atividade antioxidante, bem como a concentração dos compostos fenólicos avaliados. Esse fato é importante, tendo em vista que feijões crus possuem fatores antinutricionais e, portanto devem ser cozidos para servirem como alimentos. A maceração, em contrapartida teve efeito variável em cada uma das análises realizadas.

Referências

AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 4595-4603, 2004.

AGUILERA, Y.; ESTRELLA, I.; BENITEZ, V.; ESTEBAN, R.M.; MARTÍN-CABREJAS, M.A. Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. **Food Research International**, Essex, v. 44, p. 774-780, 2011.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, p. 865-878, 2008.

APARICIO-FERNANDEZ, X.; MANZO-BONILLA, L.; LOARCA-PIÑA, G. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, p. 73-78, 2005.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1124-1131, 2004.

ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H-P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 8, p. 567-570, 2004.

BENINGER, C.W.; HOSFIELD, G.L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7879-7883, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; ALBORES, A.; BAH, M.; CALDERÓN-SALINAS, V.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.; SHIMADA-MIYASAKA, A.; LOARCA-PIÑA, G. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plants Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, p. 161-168, 2006.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, Tegna, v. 11, p. 1321-1342, 2010.

DÍAZ-BATALLA, L.; WIDHOLM, J.M.; FAHEY JR., G.C.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; PAREDES-LÓPEZ, O. Chemical components with health implications in wild and cultivated mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2045-2052, 2006.

DINELLI, G.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; MAROTTI, I.; CATIZONE, P.; MAZZANTI, A. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 105-114, 2006.

ESPINOSA-ALONSO, L.G.; LYGIN, A.; WIDHOLM, J.M.; VALVERDE, M.E.; PAREDES-LOPEZ, O. Polyphenols in Wild and Weedy Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4436-4444, 2006.

KOSINSKA, A.; KARAMAC, M.; PENKACIK, K.; URBALEWICZ, A.; AMAROWICZ, R. Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (*Vicia faba* Major) yield soluble and non-soluble complexes. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 233, p. 213-222, 2011.

LIN, J-Y.; TANG, C-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, p. 140-147, 2007.

LIN, L-Z.; HARNLY, J.M.; PASTOR-CORRALES, M.S.; LUTHRIA, D.L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, Barking, v. 107, p. 399-410, 2008.

LUTHRIAA, D.L.; PASTOR-CORRALES, M.A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, p. 205–211, 2006.

MACHADO, C.M.; FERRUZZI, M.G.; NIELSEN, S.S. Impact of the Hard-to-Cook Phenomenon on Phenolic Antioxidants in Dry Beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 3102–3110, 2008.

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, P. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 85-90, 2005.

PRIGENT, S.V.E.; GRUPPEN, H.; VISSER, A.J.W.G.; VAN KONINGSVELD, G.A.; DE JONG, G.A.H.; VORAGEN, A.G.J. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 5088-8095, 2003.

RANILLA, L.G.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5734–5742, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROCHA-GUZMÁN, N.E.; ANNETE, H.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; IBARRA-PÉREZ, F.J.; ZAMBRANO-GALVÁN, G.; GALLEGOS-INFANTE, J.A. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, Barking, v. 103, p. 521–527, 2007.

ROMANI, A.; VIGNOLINI, P.; GALARDI, C.; MULINACCI, N.; BENEDETTELLI, S.; HEIMLER, D. Germplasm characterization of zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 3838–3842, 2004.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71–81, jan./abr. 2002.

VALDÉS, S.T.; COELHO, C.M.M.; MICHELLUTI, D.J.; CARDOSO, V.L.; TRAMONTE, G. Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Science & Technology**, London, v. 44, p. 2104–2111, 2011.

VAN DEN BERG, H.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, Barking, v. 66, p. 511–517, 1999.

XU, B.J.; CHANG, S.K.C. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 2, p. 19–27, 2008.

XU, B.J.; CHANG, S.K.C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 4754–4764, 2009.

XU, B.J.; CHANG, S.K.C. Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, p. 974–981, 2011.

YEH, C-T.; YEN, G-C. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1474–1479, 2003.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analizando feijões de colorações branca, marrom e preta, foi observado que todas as análises apontaram resultados diferentes para os feijões brancos em comparação com os mais pigmentados. Em relação à análise dos grãos íntegros de feijões quanto a compostos fenólicos e atividade antioxidante, foi observado o efeito redutor pela cocção. Em contrapartida, quando foram analisados os compostos fenólicos dos extratos de feijões, determinados por CLAE, bem como a atividade antioxidante desses extratos, observou-se aumento promovido pelo tratamento térmico. Esses resultados distintos podem ser justificados pelo fato de em grãos de feijão haver, além dos polifenóis, outros compostos que também exercem atividade antioxidante; enquanto que em extratos somente é medida a atividade antioxidante referente aos compostos fenólicos visto que há concentração destes. Há também o efeito do processo de extração que pode alterar a composição do extrato final.

A maior atividade antioxidante desempenhada pela cultivar marrom crua foi refletida na complexação dos compostos fenólicos nela presentes com a faseolina durante a análise de eletroforese. Nesta, foi observado que o gel da cultivar em questão apresentou-se com bandas na faixa de 50 kDa menos evidentes, indicando maior complexação. O efeito esperado da complexação faseolina-frações de polifenóis em reduzir a digestibilidade da faseolina foi muito discreto e muitas vezes inexistente, assim como o de aumento da digestibilidade pela cocção com ou sem maceração.