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

Grãos latino-americanos tradicionais: compostos polifenólicos, capacidade antioxidante e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo *in vitro*

Lena Gálvez Ranilla

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013946

Ficha Catalográfica

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

G182g	Gálvez Ranilla, Lena
	Grãos latino-americanos tradicionais: compostos polifenólicos, capacidade antioxidante e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo <i>in vitro</i> / Lena Gálvez Ranilla. -- São Paulo, 2008.
	286p. 156
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
	Orientador: Lajolo, Franco Maria
	1. Alimentos : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
	2. Antioxidante : Ciência dos alimentos I. T. II. Lajolo, Franco Maria, orientador.
	641 CDD

Lena Gálvez Ranilla

Grãos latino- americanos tradicionais: compostos polifenólicos, capacidade antioxidante e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Franco Maria Lajolo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 24 / 11 / 08 de ____.

La fé es el ruiseñor que canta aunque la aurora aún no despunta.
A fé é o passarinho que canta embora a aurora ainda não desponta.
The faith is the bird which sings although the sun has not risen yet.

Rabindranath Tagore

*Aos meus adorados pais
Luis Enrique e Genoveva,
Meus melhores amigos, exemplo de vida,
força espiritual e guia em tudo sentido,*

Obrigada por seu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Franco Maria Lajolo, pela oportunidade de trabalhar junto a seu grupo de pesquisa e pela orientação, apoio e atenção proporcionada durante o transcurso do trabalho, o qual certamente contribuiu muito para meu crescimento científico e intelectual.

À Prof. Dra. Maria Inés Genovese, muito obrigada pela guia, acompanhamento e recomendações oportunas durante o desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr. Kalidas Shetty, pela oportunidade de realizar uma parte do trabalho no laboratório de biotecnologia dos alimentos na *University of Massachusetts*, obrigada pela orientação e apoio durante o período sanduíche.

À Dra. Eliana Bistriche, pela amizade, conselhos e pela ajuda na revisão do português.

Ao Dr. Young-In Kwon e ao Dr. Emmanouil Apostolidis, pelo acompanhamento no desenvolvimento dos projetos realizados nos Estados Unidos, obrigada pela grande ajuda em todo momento e pela amizade.

Agradeço a Márcia, Lúcia e Tânia, sempre gentis, solícitas e pacientes quando mal conseguia me comunicar no português.

Agradeço aos meus colegas de trabalho: Ana Cristina, Adriana, Any, Aderuza, Neuza, Fernanda, Lucile, Malu, Maurício, Ricardo, Janaína, João Paulo, Marcela, Kátia, Reena que em vários momentos me brindaram sua ajuda, obrigada pela amizade.

Aos professores do Departamento de Alimentos: Prof. Dra. Beatriz, Prof. Dr. Eduardo e Prof. Dra. Elizabete que em algum momento me brindaram com seu auxílio, contribuindo com a minha formação.

Agradeço muito a Márcia, pela ajuda e conselhos durante o meu trabalho, pela solidariedade e sobretudo, pela amizade que se fortaleceu ainda mais durante a nossa convivência nos Estados Unidos. A Evelyn, a minha colega de quarto no Brasil, obrigada pela compreensão, companhia e amizade.

À CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP pelo suporte financeiro do laboratório.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Compostos fenólicos	4
2.1.1. Biossíntese e função nas plantas	4
2.1.2. Classificação	4
2.1.2.1. Ácidos fenólicos	5
2.1.2.2. Flavonóides	7
2.2. Efeitos biológicos associados aos compostos fenólicos	10
2.2.1. Compostos fenólicos e efeito antioxidante	10
2.2.2. Compostos fenólicos e diabetes tipo 2	12
2.2.3. Compostos fenólicos e hipertensão	14
2.3. Grãos originários da América Latina e potencial funcional	15
2.3.1. Feijão	15
2.3.2. Lupino	16
2.3.3. Cereais e pseudo-cereais Andinos	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivos gerais	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DO FEIJÃO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) e LUPINO (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet)	20
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1.1. Materiais	20
4.1.1.1. Feijão	20
4.1.1.2. Lupino	22

4.1.2. Reagentes	23
4.1.3. Métodos	23
4.1.3.1. Extração e quantificação de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão	23
4.1.3.2. Extração e quantificação de isoflavonas de lupino	25
4.1.3.3. Extração para a determinação de fenólicos totais, taninos e capacidade antioxidante	28
4.1.3.4. Determinação de fenólicos totais	28
4.1.3.5. Determinação de taninos condensados	28
4.1.3.6. Capacidade antioxidante	29
4.1.3.7. Determinação de umidade	29
4.1.3.8. Avaliação do efeito do processamento térmico nas cultivares selecionadas de feijão	29
4.1.3.9. Determinação do tempo de cozimento do feijão	31
4.1.3.10. Análise estatística	32
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.2.1. Compostos fenólicos do feijão	33
4.2.1.1. Casca	33
4.2.1.2. Cotilédone	44
4.2.2. Compostos fenólicos do lupino	49
4.2.2.1. Isoflavonas	49
4.2.2.2. Fenólicos totais, taninos condensados e capacidade antioxidante	58
4.2.3. Avaliação do efeito do processamento térmico sobre os perfis e teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante nas cultivares de feijão selecionadas	61
4.2.3.1. Determinação do tempo de tratamento térmico	62
4.2.3.2. Efeito sobre os perfis e teores de flavonóides e ácidos fenólicos	63
4.2.3.3. Efeito sobre os teores de fenólicos totais e capacidade	

antioxidante	78
4.3. CONCLUSÕES	88
4.3.1. Feijão	88
4.3.2. Lupino	88
4.3.3. Efeito do tratamento térmico sobre os compostos fenólicos e capacidade antioxidante das cultivares selecionadas de feijão	89
5. FUNCIONALIDADE DE GRÃOS TRADICIONAIS SELECIONADOS QUANTO A SEU POTENCIAL ANTI-HIPERGLICÊMICO E ANTI-HIPERTENSIVO	90
5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	90
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	92
5.2.1. Materiais	92
5.2.1.1. Feijões	92
5.2.1.2. Grãos Andinos	93
5.2.2. Enzimas e reagentes	93
5.2.3. Métodos	94
5.2.3.1. Preparo do extrato do feijão	94
5.2.3.2. Preparo do extrato dos grãos Andinos	94
5.2.3.3. Determinação de fenólicos totais	95
5.2.3.4. Capacidade antioxidante	95
5.2.3.5. Atividade inibitória da α -amilase	95
5.2.3.6. Atividade inibitória de α -glicosidase	96
5.2.3.7. Atividade inibitória de enzima conversora da angiotensina I (ACE-I)	97
5.2.3.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de compostos fenólicos nos extratos aquosos	98
5.2.3.9. Análise estatística	99

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
5.3.1. Funcionalidade do feijão quanto ao seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo e efeito do tratamento térmico	100
5.3.1.1. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante	100
5.3.1.2. Perfil de compostos fenólicos por CLAE	105
5.3.1.3. Inibição da α -glicosidase e α -amilase	107
5.3.1.4. Inibição da enzima conversora da angiotensina I (ACE-I)	112
5.3.2. Funcionalidade de grãos Andinos quanto ao seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo	115
5.3.2.1. Fenólicos totais, perfil de compostos fenólicos por CLAE e capacidade antioxidante	115
5.3.2.2. Inibição da α -glicosidase, α -amilase e da enzima conversora da angiotensina I (ACE-I)	121
5.4. CONCLUSÕES	126
5.4.1. Feijão e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo	126
5.4.2. Grãos Andinos e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo	127
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
8. ANEXOS	156

Ficha do aluno

Curriculum Lattes

INDICE DE TABELAS

TABELA 1	Características das cultivares de feijão avaliadas.	21
TABELA 2	Gradientes de eluição usados na determinação de isoflavonas das frações de lupino.	27
TABELA 3	Fatores e níveis avaliados no esquema fatorial 2 ³	31
TABELA 4	Flavonóides e ácidos fenólicos presentes em casca de feijão de cultivares brasileiras e peruanas	37
TABELA 5	Fenólicos totais, taninos condensados e capacidade antioxidante da casca de feijão de cultivares brasileiras e peruanas	40
TABELA 6	Coeficientes de correlação de Pearson para antocianinas, flavonóides, flavonóis, taninos, fenólicos totais e capacidade antioxidante de todas as amostras de casca de feijão avaliadas	42
TABELA 7	Flavonóides e ácidos fenólicos presentes em cotilédones de feijão de cultivares brasileiras e peruanas	46
TABELA 8	Fenólicos totais e Capacidade Antioxidante de cotilédone de feijão de cultivares brasileiras e peruanas	48
TABELA 9	Conteúdo de isoflavonas na casca, cotilédone e hipocótilo de cultivares peruanas e brasileiras de lupino	56
TABELA 10	Fenólicos totais e capacidade antioxidante da casca, cotilédone e hipocótilo de cultivares peruanas e brasileiras de lupino	59
TABELA 11	Coeficientes de correlação para os teores de fenólicos totais, isoflavonas totais e capacidade antioxidante de cultivares de <i>Lupinus mutabilis</i>	61
TABELA 12	Determinação do tempo de cozimento para os diferentes tratamentos	63
TABELA 13	Teor de compostos fenólicos (mg/100 g, base seca) do feijão preto inteiro cultivar FT Nobre cru e cozido sob diferentes condições ^a	65
TABELA 14	Valores dos efeitos calculados sobre os teores de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão inteiro cultivar FT Nobre após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2 ³ (3 fatores com 2 níveis)	66
TABELA 15	Teor de compostos fenólicos (mg/100 g, base seca) do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce cru e cozido sob diferentes condições	69

TABELA 16	Valores dos efeitos calculados sobre os teores de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2^3 (3 fatores com 2 níveis).	70
TABELA 17	Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante do feijão preto inteiro cultivar FT Nobre cru e cozido sob diferentes condições	79
TABELA 18	Valores dos efeitos calculados sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar FT Nobre após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2^3 (3 fatores com 2 níveis)	80
TABELA 19	Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce cru e cozido sob diferentes condições	81
TABELA 20	Valores dos efeitos calculados sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2^3 (3 fatores com 2 níveis).	82
TABELA 21	Características dos feijões avaliados com relação a sua funcionalidade quanto ao potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo	92
TABELA 22	Pseudo-cereais, cereais e leguminosas avaliadas com relação a sua funcionalidade quanto ao potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo.	93
TABELA 23	Coeficientes de correlação de Pearson para o feijão cru.	102
TABELA 24	Coeficientes de correlação de Pearson para o feijão cozido.	104
TABELA 25	Coeficientes de correlação de Pearson para os teores de fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade inibitória da α -glicosidase e atividade inibitória da ACE-I de pseudo-cereais, cereais e leguminosas Andinas	117
TABELA 26	Compostos fenólicos detectados por CLAE nos extratos aquosos dos grãos Andinos	117

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Biossíntese geral dos compostos fenólicos (adaptado de HOLLMAN, 2001).	5
FIGURA 2	Principais ácidos fenólicos	6
FIGURA 3	Ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico)	7
FIGURA 4	Estruturas de alguns grupos representativos de flavonóides	8
FIGURA 5	Amostras de lupinos avaliadas	22
FIGURA 6	Diagrama de fluxo do procedimento de extração de isoflavonas das frações de lupino.	26
FIGURA 7	Desenho experimental para a avaliação do efeito do processamento térmico nos teores de compostos fenólicos, fenólicos totais, taninos condensáveis e capacidade antioxidante das cultivares de feijão selecionadas	30
FIGURA 8	Cromatogramas dos glicosídeos de flavonóides neutros (A e B) e ácidos (C) extraídos da casca de feijão preto (Grupo A) FT Nobre. A: antocianinas; GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol.	34
FIGURA 9	Cromatogramas dos glicosídeos de flavonóides neutros (A) e ácidos (B) extraídos de casca de feijão cultivar BRS Tropical (8202) (Grupo D). GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; C: caempferol como aglicona.	35
FIGURA 10	Cromatogramas dos ácidos fenólicos extraídos na fração metanol (A) e metanol:amônia (B) de cotilédone de feijão preto (Grupo A) FT Nobre. AC: ácido clorogênico; AH: ácido hidroxicinâmico; AS: ácido sinápico; AF: ácido ferúlico.	44
FIGURA 11	Cromatogramas dos ácidos fenólicos extraídos na fração metanol (A) e metanol:amônia (B) de cotilédone de feijão BRS Tropical (8202) (Grupo D). AH: ácido hidroxicinâmico; AS: ácido sinápico; AF: ácido ferúlico.	45
FIGURA 12	Cromatograma característico da casca de <i>Lupinus mutabilis</i> das cultivares SLP-1, SLP-4 e H-6 (amostras hidrolisadas).	50
FIGURA 13	Cromatograma característico da casca de <i>Lupino mutabilis</i> das cultivares SCG-22, Andares, Yunguyo, <i>Lupinus albus</i> (tremoço branco) e <i>Lupinus angustifolius</i> (Azul lapar-24) (amostras hidrolisadas).	50
FIGURA 14	Mutabileína: 5,7 dihidroxi-3'-metoxiisoflavona	51

FIGURA 15	3'-O-metil orobol: 5,7,4' trihidroxi-3'-metoxiisoflavona.	51
FIGURA 16	Cromatogramas típicos do cotilédone de <i>Lupinus mutabilis</i> cultivares SLP-1, SLP-4, H-6, SCG-22, Andares e Yunguyo. A: Fração metanol, B: Fração metanol:amônia. F: flavona glicosilada não identificada; G: genistina; DG: derivado glicosilado da genisteína (amostras não hidrolisadas).	53
FIGURA 17	Cromatogramas típicos do cotilédone de A: <i>Lupinus albus</i> (tremoço branco) e B: <i>Lupinus angustifolius</i> (Azul lapar-24) na fração metanólica. F: flavona glicosilada não identificada (amostras não hidrolisadas).	53
FIGURA 18	Cromatograma típico do hipocótilo de <i>Lupinus mutabilis</i> cultivares SLP-1, SLP-4, H-6, SCG-22, Andares, Yunguyo. F: flavona não identificada, G: genisteína (amostras hidrolisadas).	54
FIGURA 19	Cromatograma típico do hipocótilo de <i>Lupinus albus</i> (A) (tremoço branco) e <i>Lupinus angustifolius</i> (B) (Azul lapar-24). F: flavona não identificada, G: genisteína (amostras hidrolisadas).	55
FIGURA 20	Conteúdo de isoflavonas totais no grão inteiro de cultivares de lupino. (a-d) Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).	58
FIGURA 21	Porcentagem de perda ou aumento do teor de flavonóides do feijão inteiro preto cultivar FT Nobre depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).	72
FIGURA 22	Porcentagem de perda ou aumento do teor de ácidos fenólicos do feijão inteiro preto cultivar FT Nobre depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).	73
FIGURA 23	Porcentagem de perda ou aumento do teor de flavonóides do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).	74
FIGURA 24	Porcentagem de perda ou aumento do teor de ácidos fenólicos do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).	75
FIGURA 25	Porcentagem de perda ou aumento do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante do feijão inteiro preto cultivar FT Nobre depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial no feijão cru, em base seca).	84
FIGURA 26	Porcentagem de perda ou aumento do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial no feijão cru, em base seca).	85

- FIGURA 27** Conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante das cultivares de feijão antes e depois do processo térmico. **101**
 (A-E) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
 (a-e) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).
- FIGURA 28** Conteúdo de ácido clorogênico nas cultivares de feijão antes e depois do processo térmico. **105**
 (A-B) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
 (a-d) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).
- FIGURA 29** Conteúdo de ácido caféico nas cultivares de feijão antes e depois do processo térmico. **106**
 (A-B) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
 (a-d) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).
- FIGURA 30** Atividade inibitória da α -glicosidase (%) no feijão cru e cozido a três diferentes doses de amostra. **108**
 (a-e) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).
- FIGURA 31** Atividade inibitória da α -glicosidase (%) e teor de fenólicos totais no feijão cru e cozido (10 mg de amostra). **109**
 (A-C) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
 (a-c) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).
- FIGURA 32** Atividade inibitória da α -amilase (%) no feijão cru a três diferentes doses de amostra. **110**
 (a-b) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
- FIGURA 33** Atividade inibitória da α -amilase (%) e teor de fenólicos totais no feijão cru e cozido (100 mg de amostra). **111**
 (A-B) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
 (a-c) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).
- FIGURA 34** Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (%) no feijão cru e cozido a três diferentes doses de amostra. **113**
 (A-D) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
 (a-g) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

- FIGURA 35** Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (%) **116**
no feijão cru e cozido a três diferentes doses de amostra.
(A-D) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).
(a-g) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).
- FIGURA 36** Atividade inibitória da α -glicosidase (%) a três diferentes doses **122**
de amostra comparado com os teores de fenólicos totais nos grãos Andinos.
Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).
- FIGURA 37** Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (%) **124**
comparado com os teores de fenólicos totais nos grãos Andinos.
Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

ABREVIATÖES

A – antocianinas

AC – ácido clorogênico

ACaf – ácido caféico

ACE-I – (*angiotensin I-converting enzyme*), enzima conversora da angiotensina I

ACo – ácido *p*-coumárico

ADN – ácido desoxirribonucléico

AF – ácido ferúlico

AFT – ácidos fenólicos totais

AH – ácidos hidroxicinâmicos

AMI – atividade inibitória da α -amilase

AOAC – *Association Official of Analytical Chemists*

ARN- ácido ribonucléico

AS – ácido sinápico

b.s. – base seca

b.u. – base úmida

C – caempferol como aglicona

CA – capacidade antioxidante

CAT – catequina

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – (*Diode Array Detector*) detector de arranjo de diodo

DCNT - doenças crônicas não transmissíveis

DG – derivado da genisteína

DPPH• – radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

F – flavona não identificada

FL – flavonóis

- FT** – fenólicos totais
- FVT** – flavonóides totais
- G** – genisteína
- GC** – glicosídeos de caempferol
- GLIC** – atividade inibitória da α -glicosidase
- GQ** – glicosídeos de quercetina
- HPLC** – *High Performance Liquid Chromatographic*
- M** – miricetina
- MEOH** – metanol
- ON** – Óxido nítrico
- PTFE** – politetrafluoroetileno
- T** – taninos condensados
- U** – unidade de atividade enzimática
- UV** – ultravioleta

RESUMO

RANILLA, L. G. Grãos latino-americanos tradicionais: compostos polifenólicos, capacidade antioxidante e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo *in vitro*.

A incidência de doenças crônicas não transmissíveis como a diabetes tipo 2 e complicações cardiovasculares tem aumentado significativamente, e tem-se associado principalmente às mudanças nos hábitos alimentares tradicionais. O objetivo do presente estudo foi caracterizar diferentes cultivares de feijão, lupino e grãos da região dos Andes quanto a seus compostos fenólicos antioxidantes, capacidade antioxidante e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo *in vitro*. Dependendo do tipo de cultivar, o feijão é uma fonte promissora de taninos condensados, antocianinas, e flavonóis; enquanto que o lupino andino destacou-se pela presença de isoflavonas. Após o tratamento térmico, o feijão e lupino andino inibiram significativamente a enzima conversora da angiotensina I, relevante na prevenção da hipertensão, enquanto o milho roxo andino inibiu a α -glicosidase, relevante na prevenção da hiperglicemia. Uma combinação apropriada de grãos tradicionais como parte da dieta poderia contribuir na modulação dos níveis de glicose e na prevenção das complicações relacionadas ao desequilíbrio óxido-redução.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos polifenólicos. Grãos latino-americanos. Capacidade antioxidante. Hiperglicemia. Hipertensão.

ABSTRACT

RANILLA, L. G. Traditional Latin American grains: polyphenolic compounds, antioxidant capacity and anti-hyperglycemia and anti-hypertension potential *in vitro*.

Incidence of chronic diseases such as diabetes type 2 and related cardiovascular complications has increased significantly due mainly to current changes in traditional food dietary habits. The objective of this study was to characterize several bean and lupin cultivars along with grains from the Andean region in relation to their phenolic compounds, antioxidant capacity and anti-diabetes and anti-hypertension potential using *in vitro* assays. Depending on the cultivar, beans are interesting sources of condensed tannins, anthocyanins and flavonols, whereas major phenolic compounds in Andean lupins were isoflavones. Following thermal treatment, selected beans and Andean lupins inhibited significantly the hypertension relevant angiotensin I-converting enzyme and among Andean grains, the purple corn inhibited the hyperglycemia relevant α -glucosidase. A good combination of traditional grains as a part of the overall diet can contribute to effective dietary strategies for managing Type 2 diabetes and associated complications linked to unbalanced cellular redox status.

KEYWORDS: Polyphenolic compounds. Latin American grains. Antioxidant capacity. Hyperglycemia. Hypertension.

1. INTRODUÇÃO

A América Latina abrange um vasto território e uma população culturalmente diversificada. Todavia, com a urbanização em toda a região, as questões de saúde que surgem são comparáveis às dos demais países ocidentalizados; doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), associadas ao consumo de alimentos altamente energéticos em combinação com atividade física reduzida estão aumentando em prevalência (RIVERA *et al.*, 2002). A mudança nos padrões alimentares produzida, entre outros fatores, pela denominada “globalização” e o incremento da urbanização, estão conduzindo a um menor consumo de alimentos nativos com propriedades nutricionais e funcionais importantes. Esses alimentos vêm sendo gradualmente substituídos por dietas com altos teores de açúcares e lipídios refinados, e excesso de produtos de origem animal, situação que está levando ao rápido aumento da obesidade e da síndrome metabólica, que é definida como uma série de fatores fisiológicos de risco precursores de DCNT como a diabetes tipo 2, e complicações cardiovasculares (BERMÚDEZ & TUCKER, 2003; WILSON *et al.*, 2005; WHO, 2006).

Essa substituição tem acontecido, por exemplo com o feijão, uma leguminosa característica de vários países da América Latina como o Brasil, o México e outros da América Central. Segundo alguns estudos, o consumo de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) tem diminuído rapidamente entre a população urbana, sobretudo nos grupos de jovens e crianças, e juntamente com outras leguminosas, cereais e tubérculos têm sido substituído por uma dieta rica em lipídios e proteína de origem animal (MONDINI & MONTEIRO, 1994; LETERME & MUÑOZ, 2002). A situação alimentar é similar nos países andinos como o Peru, onde os problemas de migração das regiões rurais (Andes) para as áreas urbanas (litoral) estão sendo associados a um aumento do risco de doenças cardiovasculares, especialmente nos grupos indígenas (LINDGÄRDE *et al.*, 2004).

Nos próximos 10 anos vem sendo projetado um incremento de 38% na prevalência de diabetes tipo 2 na América Latina e, se a atual problemática alimentar continuar, espera-se que para o ano 2025 o número de casos seja ainda maior que nos Estados Unidos, Canadá e a Europa (ASCHNER, 2002). Paralelamente muitos estudos vêm

associando a presença de compostos bioativos à prevenção de DCNT; assim devem ser estimuladas mais pesquisas relacionadas com a caracterização desses compostos e o conseqüente potencial funcional de alimentos nativos. Além disso, é importante promover o retorno a uma dieta tradicional saudável, e dessa forma contribuir com a diminuição das DCNT associadas às atuais mudanças de hábitos alimentares.

Leguminosas originárias da América Latina como o feijão, e o lupino andino (*Lupinus mutabilis* Sweet), e os grãos andinos como a Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), a Kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.), a Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) e o milho (*Zea mays* L.), constituem um recurso potencial para América do Sul e outras regiões dos países em desenvolvimento devido a suas excepcionais características nutricionais com o potencial de aliviar a desnutrição. Em geral, os grãos andinos têm mostrado um alto nível de resistência às secas, frio, alta salinidade, pragas e doenças (JACOBSEN *et al.*, 2003). Conseqüentemente, esses alimentos podem constituir também fontes promissoras de diversos metabólitos secundários (fitoquímicos) os quais são sintetizados pelas plantas frente a condições climáticas e de crescimento adversos. Os fitoquímicos, e em particular os compostos fenólicos, são compostos bioativos característicos das frutas, vegetais, grãos e outros alimentos de origem vegetal. Esses metabólitos estão envolvidos não somente em processos de defesa e proteção da planta (função primária) (BENNET & WALLSGROVE, 1994), mas também vêm sendo relacionados com a redução do risco de diversas DCNT quando ingeridos regularmente através da dieta (LIU, 2004; DEMBINSKA-KIEC *et al.*, 2008). De acordo com diversos estudos epidemiológicos os compostos fenólicos, um grande grupo de antioxidantes naturais, vêm sendo associados ao efeito protetor observado nos vegetais e frutas contra o câncer e as doenças cardiovasculares (ARTS & HOLLMAN, 2005; SCALBERT *et al.*, 2005a).

Considerando o exposto anteriormente, e a reduzida informação existente sobre o conteúdo e o perfil de compostos fenólicos em leguminosas e grãos tradicionais originários da América Latina, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) e diversos grãos representativos da região dos Andes como o milho (*Zea mays* L.), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) e Kiwicha

(*Amaranthus caudatus* L.) quanto a seus compostos fenólicos, capacidade antioxidante e funcionalidade associada ao seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo utilizando ensaios *in vitro*. Dessa forma, a presente pesquisa teve por finalidade estudar o potencial desses alimentos como fontes de substâncias bioativas, a fim de fomentar seu consumo e valorização pela população desses países.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Compostos polifenólicos

2.1.1 Biossíntese e função nas plantas

Os compostos fenólicos ou polifenólicos constituem um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos do reino vegetal, com mais de 8000 estruturas fenólicas até agora conhecidas. Os polifenóis são produtos do metabolismo secundário das plantas derivados da fenilalanina e, em menor proporção, da tirosina (BRAVO, 1998; SHAHIDI & NACZK, 2004). A fenilalanina é desaminada até ácido cinâmico, o qual entra na via fenilpropanol, sendo que o passo chave nesta via metabólica é a introdução de um ou mais grupos hidroxila dentro do anel fenil, produzindo assim os fenóis. Como resultado, os compostos fenólicos são derivados de uma mesma estrutura: a unidade fenilpropanol ($C_6 - C_3$) (HOLLMAN, 2001).

Esse conjunto de substâncias são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e conferem proteção contra depredadores e patógenos. Além disso, os fenólicos têm uma função como antibióticos, pesticidas naturais e agentes protetores contra a luz ultravioleta (UV). A contribuição dos fenólicos na coloração das plantas também tem sido reconhecida (SHAHIDI & NACZK, 2004).

2.1.2 Classificação

De acordo com HARBORNE (1989), os polifenóis podem se dividir em pelo menos 10 classes diferentes, dependendo da estrutura química básica (Figura 1); porém, as principais classes correspondem aos ácidos fenólicos e os flavonóides, sendo as menos comuns os estilbenos e os lignanos (TAPIERO *et al.*, 2002).

Figura 1. Biossíntese geral dos compostos fenólicos (adaptado de HOLLMAN, 2001).

2.1.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em duas classes: derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico (Figura 2).

Geralmente o conteúdo de ácidos hidroxibenzoicos nas plantas é muito baixo, com exceção de certas frutas e vegetais, as quais podem chegar a ter concentrações maiores que 10 mg/Kg de amostra úmida (SHAHIDI, 1995). Além disso, os ácidos hidroxibenzoicos são componentes de estruturas mais complexas como os taninos hidrolisáveis (galotaninos em manga e elagitaninos em frutas vermelhas como o morango e outras frutas do mesmo gênero) (CLIFFORD & SCALBERT, 2000).

Por outro lado, os derivados do ácido cinâmico são mais comuns que os anteriores, e se encontram amplamente distribuídos na forma conjugada em plantas, incluindo muitos alimentos de origem vegetal e bebidas. Esses compostos raramente estão em forma de ácidos livres em alimentos crus; porém, podem ser analisados depois de sua deconjugação e determinados como ácidos livres (CLIFFORD, 2000).

ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS	Posição do OH
Salicílico	2
Protocatecuico	3,4
Gálico	3,4,5
Siringico	4; 3,5-OCH ₃

ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	Posição do OH
<i>p</i> -Cumárico	4
Caféico	3,4
Ferúlico	4, 3-OCH ₃

Figura 2. Principais ácidos fenólicos

As formas conjugadas dos ácidos cinâmicos incluem derivados glicosilados ou ésteres do ácido quínico, chiquímico e tartárico. Nesse sentido, o ácido caféico e quínico se combinam para dar origem ao ácido clorogênico (Figura 3), um dos ácidos conjugados mais conhecidos e distribuídos em muitas classes de frutas, encontrando-se em elevadas concentrações no café; uma xícara pode conter entre 70 e 350 mg de ácido clorogênico (MANACH *et al.*, 2004).

Figura 3. Ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico)

2.1.2.2 Flavonóides

Constituem o grupo mais abundante presente nos alimentos e representam uma subclasse de polifenóis caracterizados por apresentarem a estrutura básica: $C_6-C_3-C_6$. Biogeneticamente, o anel A usualmente procede de uma molécula de resorcinol, o fluoroglucinol sintetizado na via acetato, enquanto que o anel B é derivado da via chiquimato. Os flavonóides ocorrem comumente na forma glicosídica, embora ocasionalmente podem se apresentar na forma aglicona (BRAVO, 1998). De acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico, os flavonóides podem se dividir em várias classes: flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, flavanóis, proantocianidinas e flavanonas (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000) (Figura 4).

FLAVONÓIS	Posição do OH
Quercetina	3,5,7,3',4'
Caempferol	3,5,7,4'
Miricetina	3,5,7,3',4',5'

FLAVONAS	Posição do OH
Luteolina	5,7,3',4'
Apigenina	5,7,4'
Crisina	5,7

FLAVANÓIS	Posição do OH
Catequina	3,5,7,3',4'
Epicatequina	3,5,7,3',4'

FLAVANONAS	Posição do OH
Naringenina	5,7,4'
Taxifolina	3,5,7,3',4'

Cont.

Figura 4. Estruturas de alguns grupos representativos de flavonóides.

Cont.

ANTOCIANIDINAS	Posição do OH
Delphinidina	3,5,7,3',4',5'
Cianidina	3,5,7,3',4'
Pelargonidina	3,5,7,4'

ISOFLAVONAS	Posição do OH
Daidzeína	7,4'
Genisteína	5,7,4'

PROANTOCIANIDINAS OU TANINOS CONDENSADOS

Figura 4. Estruturas de alguns grupos representativos de flavonóides (continuação).

2.2 Efeitos biológicos associados aos compostos fenólicos

2.2.1 Compostos fenólicos e efeito antioxidante

Reações de oxidação e redução constituem a base de inúmeros mecanismos bioquímicos celulares importantes para o normal funcionamento do organismo. O ambiente de óxido-redução é importante no balanço de energia, transdução de sinais, ativação enzimática, síntese de ADN e ARN, proliferação celular, e na diferenciação e apoptose da célula (ARRIGO, 1999; VALENCIA & MORAN, 2004). O processo de oxidação é importante na manutenção da vida, já que a energia é produzida a partir de moléculas redutoras através da fosforilação oxidativa na mitocôndria, sendo o oxigênio molecular oceptor final de elétrons (RICH, 2003). Quando o equilíbrio óxido-redução (homeostase) é alterado na célula, seja por uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) ao nível mitocondrial (BROWNLEE, 2005) ou por uma disfunção do sistema antioxidante endógeno (MOREL & BAROUKI, 1999), manifesta-se um quadro de estresse oxidativo que conduz ao dano celular. De acordo com vários estudos, o estresse oxidativo tem sido associado com a etiologia de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como o câncer, doenças cardiovasculares e o envelhecimento em geral (MAYNE, 2003; BARREIRO *et al.*, 2005; BARTSCH & NAIR, 2006; VALKO *et al.*, 2006).

Portanto, um controle adequado do equilíbrio celular de oxido-redução (redox) e do balanço energético do metabolismo associado à produção de espécies reativas de oxigênio é de vital importância para a manutenção da homeostase e proteção celular.

Diversos estudos epidemiológicos, ensaios experimentais em animais e cultivos de células humanas sugerem que há um papel importante de compostos fenólicos provenientes da dieta atuando na redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes ou osteoporose (SCALBERT *et al.*, 2005b, LAMBERT *et al.*, 2005; ARTS & HOLLMAN, 2005; ARTS, 2008). Nesse sentido, as propriedades antioxidantes atribuídas aos fenólicos parecem desempenhar uma importante função. A evidência científica

indica que os compostos fenólicos podem evitar o dano oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio e radicais livres a biomoléculas vitais como DNA, lipídeos e proteínas (PIETT, 2000; NOGUCHI & NIKKI, 2000; HOLLMAN, 2001). Dessa forma, os compostos fenólicos podem constituir elementos importantes na proteção da homeostase óxido-redução na célula e contribuir na redução do risco das DCNT associadas ao estresse oxidativo.

SCALBERT *et al.* (2005b) indicam que a capacidade antioxidante dos polifenóis está associada a sua estrutura química; nesse sentido, os grupos fenólicos podem aceitar um elétron para formar um radical fenoxil relativamente estável, produzindo assim a ruptura das reações de oxidação nos componentes celulares. Similarmente, RICE-EVANS *et al.* (1997) mencionam que as propriedades redutoras dos polifenóis, como compostos doadores de elétrons, indicam seu potencial para atuar como agentes seqüestradores de radicais livres, chegando a mostrar *in vitro* uma atividade ainda maior que algumas vitaminas antioxidantes como a vitamina E e C.

Por outro lado, tem-se reportado que os compostos fenólicos derivados da dieta também podem modular a resposta antioxidante da célula, através da estimulação de enzimas antioxidantes como a superoxidodismutase (SOD) e catalase (CAT) (SHETTY & WAHLQVIST, 2004; RANDHIR *et al.*, 2005), ou mediante a inibição de várias enzimas que catalisam reações produtoras de espécies reativas de oxigênio como a xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, monooxigenase microsomal, glutathiona-S-transferase, succinoxidase mitocondrial e a NADPH oxidase (MANACH *et al.*, 2005).

Recentemente, estudos ao nível molecular têm relatado o potencial de alguns compostos fenólicos na modulação da expressão gênica de enzimas relacionadas com mecanismos protetores da célula contra o estresse oxidativo. Assim, a epigallocatequina-3-galato, o maior polifenol do chá verde, tem mostrado a propriedade de induzir a expressão da glutathiona-S-transferase, a glutathiona peroxidase, e a glutamato cisteína ligase, enzimas responsáveis pela inativação das espécies reativas de oxigênio (NA & SURH, 2007). Além disso, NICHOLSON *et al.* (2008), em experimentos realizados com células endoteliais humanas sob

estresse oxidativo, encontraram que o resveratrol estimulou a expressão do gene responsável pela codificação da óxido nítrico-sintase, enzima envolvida na síntese do vasodilatador óxido nítrico (ON), demonstrando dessa forma o potencial do resveratrol de diminuir a pressão sanguínea e o risco de doenças cardiovasculares.

2.2.2 Compostos fenólicos e diabetes tipo 2

A diabetes mellitus é uma doença crônica causada por um balanço inapropriado na homeostase da glicose (ROSETTI *et al.*, 1990). A diabetes mellitus é uma desordem metabólica muito séria que tem um impacto significativo na saúde, qualidade de vida e expectativa de vida dos pacientes com essa doença, assim como nos sistemas de saúde atuais. No mínimo 171 milhões de pessoas no mundo já apresentam diabetes e, segundo as projeções, esse número poderia ultrapassar o dobro em 2030 (WHO, 2006). Existem dois tipos de diabetes, a denominada insulina-dependente (tipo 1) e a não insulina-dependente (tipo 2) (ECDCDM, 2002). Enquanto a diabetes tipo 1 pode ser controlada efetivamente com uma administração apropriada de insulina, é difícil encontrar um tratamento efetivo para a diabetes tipo 2, a qual constitui mais de 90% dos casos de diabetes (NATHAN, 1997).

A hiperglicemia, uma condição caracterizada pelo aumento pós-prandial anormal de glicose no sangue, tem sido relacionada com a prevalência de diabetes tipo 2 e, ao mesmo tempo, com o aumento de complicações cardiovasculares de origem oxidativa (DICARLI *et al.*, 2003). Estudos recentes têm mostrado que o incremento de glicose no sangue promove a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres ao nível mitocondrial (BROWNLEE, 2005; LOWELL & SHULLMAN, 2005). De fato, a diabetes tipo 2 afeta significativamente o sistema cardiovascular, tanto ao nível microvascular quanto ao macrovascular. Como consequência, a diabetes tipo 2 ultrapassa outras condições como a dislipidemia e a hipertensão (CHENG, 2005; MATSUI *et al.*, 2006; LUSCHER & STEFFEL, 2008).

As maiores fontes de glicose no sangue provêm da hidrólise dos carboidratos da dieta, como o amido. A glicose é produto da hidrólise dos carboidratos por um grupo de enzimas hidrolíticas que incluem a α -amilase pancreática e diversas α -glicosidases intestinais, e é absorvida pelos eritrócitos do intestino delgado (HARRIS & ZIMMER, 1992; BISCHOFF, 1994). A inibição dessas enzimas envolvidas na digestão e absorção dos carboidratos pode diminuir significativamente a elevação da glicemia pós-prandial e, dessa forma, constituir uma estratégia importante no controle da diabetes tipo 2 (STUART *et al.*, 2004). A esse respeito, vários inibidores da α -amilase e α -glucosidase como a acarbose, trestatina, e amilostatina têm sido isolados a partir de microrganismos e estão sendo atualmente comercializados como moduladores da absorção de glicose no intestino (DOLECKOVÁ-MARESOVÁ *et al.*, 2005; HANEFELD, 2007). Porém, vários efeitos colaterais como flatulência, diarreia, dor abdominal e hepatite também têm sido reportados como consequência do uso desses inibidores (CARRASCOSA, 1997; CHARPENTIER *et al.*, 2000). Alguns trabalhos têm sugerido que a acarbose e produtos similares inibem significativamente a α -amilase pancreática, dando lugar a uma fermentação bacteriana anormal dos carboidratos não digeridos no cólon produzindo os efeitos adversos mencionados anteriormente (BISCHOFF *et al.*, 1985; HORII *et al.*, 1987). Portanto, o consumo de inibidores naturais provenientes da dieta poderia constituir uma terapia efetiva e de baixo custo para o controle da hiperglicemia com mínimos efeitos adversos, ao contrário dos produtos farmacológicos atualmente usados (KWON *et al.*, 2006a; MATSUI *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos mostram o potencial dos compostos fenólicos como inibidores naturais das enzimas associadas ao metabolismo dos carboidratos. Em estudos *in vitro*, KWON *et al.* (2006b) encontraram uma correlação significativa entre a presença de certos compostos fenólicos próprios de ervas pertencentes à família *Lamiaceae* e sua elevada atividade inibitória contra a α -glicosidase e α -amilase. A catequina, o ácido caféico, o ácido rosmarínico e o resveratrol foram os fenólicos com maior poder inibitório dessas enzimas (99, 91, 85 e 71%, respectivamente). Igualmente, extratos aquosos de chá preto, ricos em compostos

fenólicos, têm mostrado elevadas atividades inibitórias da α -glicosidase, enquanto que o vinho tinto, com teores elevados de compostos fenólicos totais, inibiu significativamente a α -glicosidase quando comparado com o vinho branco (KWON *et al.*, 2008). Recentemente, ANI & NAIDU (2008) indicaram que o extrato de cominho preto, rico em ácidos fenólicos como ácido gálico, protocatecuico, caféico, elágico, ferúlico e em flavonóides como a quercetina e kaempferol, mostrou uma inibição significativa da atividade α -glicosidase intestinal *in vitro* e também reduziu a hiperglicemia pós-prandial em ratos. Além disso, JUNG *et al.* (2006) detectaram em diversas plantas medicinais ricas em flavonóides e outros polifenóis, incluindo as suas formas glicosiladas, elevadas atividades inibitórias da α -glicosidase.

Dessa forma, o desenho de estratégias dietéticas adequadas que incluam compostos fenólicos com elevada atividade inibitória da α -glicosidase e capacidade antioxidante, poderia ser não somente importante na modulação do consumo de glicose mas também na manutenção do equilíbrio de óxido-redução através do controle na produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela hiperglicemia (KWON *et al.*, 2006a).

2.2.3 Compostos fenólicos e efeito anti-hipertensivo

Outra função biológica bem documentada dos compostos fenólicos é seu potencial na redução do risco de doenças cardiovasculares. Está bem estabelecido, por exemplo, que a incidência de doenças cardiovasculares é menor em populações consumidoras de vinho tinto como parte regular da dieta (FERRIERES *et al.*, 2004). Estudos dos efeitos benéficos do vinho tinto têm relatado que compostos fenólicos como as antocianinas, ácidos hidroxicinâmicos, ácido benzóico, taninos e o resveratrol seriam os responsáveis do também conhecido “paradoxo francês”, o qual é definido como a baixa incidência de doenças coronarianas associada ao consumo habitual de vinho juntamente com dietas ricas em gordura saturada (HERTOG *et al.*, 1995; VIDAVALUR *et al.*, 2006). VITA (2005) observou que os flavonóides melhoram a função endotelial e inibem a agregação plaquetária em humanos. O endotélio vascular é um regulador crítico da homeostase vascular e a disfunção endotelial contribui com a patogênese e a

expressão clínica das doenças arteriais coronarianas. Além disso, NEGISHI *et al.* (2004) reportaram que os compostos fenólicos dos chás preto e verde, como as teaflavinas, flavonóis e catequinas, contribuíram para a redução da hipertensão quando avaliados em um modelo *in vivo* com ratos diabéticos induzidos geneticamente, concluindo que o consumo regular de chá poderia proporcionar proteção contra a hipertensão em humanos.

A hipertensão é um fator de risco para muitas doenças cardiovasculares e também é uma das complicações a longo prazo da diabetes tipo 2. A enzima conversora da angiotensina I (ACE) é uma enzima chave envolvida na manutenção da tensão vascular. A ACE converte o dipeptídeo histidil-leucina denominado como angiotensina I em angiotensina II, composto que é um potente vasoconstritor. A angiotensina II também estimula a síntese e a liberação da aldosterona, a qual tem demonstrado estar implicada no aumento da pressão arterial mediante a retenção de sódio nos túbulos distais (LIEBERMAN, 1975). A inibição da ACE é considerada um elemento terapêutico importante no tratamento da hipertensão em pacientes diabéticos e não diabéticos (JOHNSTON & VOLHARD 1992; CROOK & PENUMALEE, 2004).

Estudos *in vitro* têm relatado que dependendo da estrutura química, as proantocianidinas apresentam a capacidade de inibir a enzima conversora da angiotensina I (OTTAVIANI *et al.*, 2006). SARR *et al.* (2006) reportaram o efeito preventivo do consumo regular de compostos fenólicos do vinho tinto na hipertensão induzida pela atividade da angiotensina II em ratos. Portanto, os compostos fenólicos presentes na dieta apresentam um potencial interessante no tratamento ou prevenção da hipertensão.

2.3 Grãos originários da América Latina e potencial funcional

2.3.1 Feijão

Entre as diversas leguminosas, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é amplamente consumido no mundo e é uma importante fonte de proteína vegetal em muitos países. Na América Latina, o Brasil é um dos maiores produtores de

feijão (GONÇALVES & SOUZA, 1998) e um dos mais importantes consumidores dessa leguminosa (15,9 Kg/capita por ano), enquanto que em países andinos como o Peru, o consumo de feijão é baixo (1,2 Kg/capita por ano), embora outras leguminosas e grãos representam a principal fonte protéica (FAOSTAT, 2005).

Além de suas propriedades nutricionais, o feijão também tem despertado um crescente interesse como alimento funcional pois, como qualquer outra leguminosa, contém um número considerável de compostos bioativos como inibidores de enzimas, lectinas, fitatos, oligossacarídeos e substâncias fenólicas que podem exercer um efeito metabólico benéfico nas populações que consomem esse alimento com frequência (DIAZ BATALLA *et al.*, 2006).

A capacidade antioxidante (DIAZ BATALLA *et al.*, 2006), antimutagênica (CARDADOR-MARTINEZ *et al.*, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2003) e o recentemente estudado efeito antiproliferativo do feijão (APARICIO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006) têm sido associados com a presença de compostos fenólicos, e isso poderia explicar as numerosas evidências científicas que sugerem que o consumo de leguminosas como o feijão estaria relacionado com vários efeitos benéficos à saúde, como a redução das doenças coronarianas (BAZZANO *et al.*, 2001), efeito protetor contra o câncer (HANGEN & BENNIK, 2002) e a redução da diabetes e do risco de obesidade (GEIL & ANDERSON, 1994).

2.3.2 Lupino

O gênero *Lupinus*, também da família Leguminosae tem quase 300 espécies, mas somente 4 têm sido mais estudadas. Três delas (*Lupinus albus*, *Lupinus luteus* e *Lupinus angustifolius*) são originárias da região do Mediterrâneo, entretanto, a quarta, *Lupinus mutabilis* Sweet, é própria da região dos Andes na América do sul (PUTNAM, 1991).

Nutricionalmente, o lupino oferece várias vantagens em comparação com a soja (*Glycine max*). As sementes de lupino apresentam baixos teores de inibidores de tripsina, taninos, fitatos e saponinas (SCHOENEBERGER *et al.*, 1982; KYLE, 1994). A espécie *mutabilis*, também conhecida como “Tarwi” apresenta o maior teor de proteína e lipídeos de todas as espécies domesticadas de lupino e o valor

nutritivo de sua proteína é comparável à proteína de soja (SALMANOWICZ, 1999). Porém, PEDROSA *et al.* (1996) indicaram que um fator negativo das sementes do lupino é a presença de alcalóides amargos e tóxicos. Esses compostos são complexos quinilizidínicos, que derivam da quinolizidina e cada variedade tem diferentes alcalóides em diferentes concentrações.

Com relação às propriedades funcionais do lupino, TSALIKI *et al.* (1999) encontraram uma correlação significativa entre a elevada capacidade antioxidante da espécie *L. albus* e os teores totais de compostos fenólicos e fosfolipídios. Além disso, ácidos fenólicos livres e hidrolisáveis e procianidinas têm sido também detectados em sementes de lupino (SOSULSKI AND DABROSKI, 1984; DA SILVA *et al.*, 1993; LAMPART-SZCZAPA *et al.*, 2003). Por outro lado, as espécies *L. albus*, *L. luteus* e *L. angustifolius* tem mostrado atividade antibacteriana associada à presença de compostos fenólicos (LAMPART-SZCZAPA *et al.*, 2003). Não obstante, ainda são poucos os estudos referidos ao potencial funcional dessa leguminosa, em especial da espécie *mutabilis*, característica na América Latina.

2.3.3 Cereais e pseudo-cereais Andinos

A região dos Andes forma uma grande corrente de montanhas de aproximadamente 7000 km de comprimento que se estende desde o sul da Venezuela até o sul do Chile. Os Andes abrangem uma ampla diversidade de ecossistemas e apresentam uma rica variedade de plantas, animais e comunidades humanas (LINDHOUT *et al.*, 2007). Os grãos Andinos tem sido cultivados por milhares de anos, desde tempos pré-Colombianos e incluem os “pseudo-cereais” como a Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) e o Amaranto (*Amaranthus caudatus* L.), e uma grande variedade de milhos (*Zea mays* L.) pigmentados, sendo o milho roxo o mais representativo e consumido entre esses cereais (JACOBSEN *et al.*, 2003).

Do ponto de vista nutricional, o balanço protéico dos pseudo-cereais Andinos é muito próximo ao balanço ideal, sendo igual ou similar àquele apresentado pela proteína do leite, apresentando, particularmente, um alto teor de lisina (DINI *et al.*, 2005). Quanto ao potencial funcional, existem alguns estudos

que reportam a presença de compostos bioativos em alguns grãos Andinos. Assim, flavonóides como glicosídeos de caempferol e quercetina têm sido identificados na variedade “Kancolla” da Quinoa (DINI *et al.*, 2004). Igualmente, RASTRELLI *et al.* (1995) detectaram um novo flavonol triglicosídeo em sementes de Kañiwa. Adicionalmente, o milho roxo tem demonstrado propriedades funcionais interessantes como elevada capacidade antioxidante (CEVALLOS-CASALS *et al.*, 2003a), alto potencial antimicrobiano (CEVALLOS-CASALS *et al.*, 2003b), além de atuar na prevenção da obesidade e na diminuição da hiperglicemia em ratos (TSUDA *et al.*, 2003), características associadas principalmente aos elevados teores de antocianinas nesse tipo de milho. Porém, outros compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonóis, também detectados no milho roxo, mostraram importantes propriedades anti-mutagênicas *in vitro* (PEDRESCHI *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Investigar as leguminosas tradicionalmente consumidas em países da América Latina como fontes potenciais de compostos fenólicos antioxidantes.
- Estudar a funcionalidade de grãos tradicionais selecionados quanto a seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo utilizando ensaios *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar um “screening” dos perfis e teores de compostos fenólicos de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) consumidos no Brasil e no Peru nas frações casca, cotilédone e hipocótilo.
- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* das frações da semente (casca, cotilédone e hipocótilo) das cultivares em estudo.
- Avaliar o efeito do processamento térmico sobre os perfis e teores de compostos fenólicos das cultivares de feijão selecionadas.
- Determinar a atividade inibitória da α -glicosidase e α -amilase associada ao potencial anti-hiperglicêmico e a atividade inibitória de enzima conversora da angiotensina I associada ao potencial anti-hipertensivo de cultivares selecionadas de feijão procedentes do Brasil e do Peru e suas possíveis alterações por efeito do tratamento térmico.
- Estudar a funcionalidade relacionada ao potencial anti-hiperglicêmico (atividade inibitória da α -glucosidase e α -amilase) e anti-hipertensivo (atividade inibitória de enzima conversora da angiotensina I) de grãos tradicionalmente consumidos na região dos Andes como a Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), Kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.), lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) e diferentes variedades de milho pigmentado (*Zea mays* L.).

4. COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* DO FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) e LUPINO (*Lupinus mutabilis* Sweet)

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Materiais

4.1.1.1 Feijão

As 25 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foram obtidas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e 3 do Programa de Cereais e Leguminosas da Universidade Nacional Agrária La Molina (Lima-Peru), sendo que a cultivar INIA-6, foi a única da espécie *Phaseolus lunatus* L. As sementes foram colhidas de plantas diferentes e depois de sua colheita foram armazenadas em câmara fria (4 °C) e avaliadas num período não superior a dois anos.

Procedeu-se à separação manual da casca, e as frações obtidas (casca e cotilédone) foram moídas sob refrigeração num moinho IKA WORKS, INC (Willmington, NC, E.U.A) até a obtenção de uma farinha com diâmetro de partícula de 60 mesh (0,250 mm). A porcentagem média da fração cotilédone e casca com relação ao peso total da semente de feijão foi de $88,2 \pm 1,5\%$ e $9,1 \pm 0,6\%$, respectivamente. As amostras assim preparadas foram armazenadas a -18 °C até as análises posteriores. Os hipocótilos foram removidos dos cotilédones e não foram considerados no estudo por apresentarem um conteúdo muito reduzido de compostos fenólicos ($<1\text{ mg}/100\text{ g}$).

As cultivares avaliadas foram classificadas de acordo com as características e a cor da casca (Tabela 1).

Tabela 1. Características das cultivares de feijão avaliadas.

Nº	Cultivar		Grupo	Cor e características da casca	Origem
1	FT Nobre		A	preta	Brasil
2	BRS Triunfo (7762)		A	preta	Brasil
3	BRS Campeiro		A	preta	Brasil
4	Diamante negro		A	preta	Brasil
5	BRS Grafite		A	preta	Brasil
6	BRS Valente		A	preta	Brasil
7	Uirapuru		A	preta	Brasil
8	BRS Timbó		B	vermelha	Brasil
9	CNFRX (7866)		B	vermelha	Brasil
10	BRS Radiante		C	marrom claro com listras vermelhas	Brasil
11	Iraí		C	marrom claro com listras vermelhas	Brasil
12	BRS Tropical (8202)		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
13	Pérola		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
14	BRS Requite		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
15	Talismã		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
16	Magnífico		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
17	Carioca		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
18	Iapar 81		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
19	BRS Pontal		D	marrom claro com listras marrons	Brasil
20	Jalo precoce		E	marrom amarelada	Brasil
21	Jalo EEP 558		E	marrom amarelada	Brasil
22	BRS Vereda		F	marrom rosa	Brasil
23	IPA-6		G	marrom claro	Brasil
24	Marfim		G	marrom claro	Brasil
25	Ouro branco		H	branca	Brasil
26	INIA-6		H	branca	Peru
27	Canario centenario		I	amarela	Peru
28	Pavita molinera		J	branca com pontos pretos	Peru

4.1.1.2 Lupino

Na Figura 5 são apresentadas as fotos das cultivares de lupino avaliadas. As 6 cultivares peruanas de lupino (*Lupinus mutabilis*) foram fornecidas pelo Programa de Leguminosas da Universidade Nacional Agrária La Molina (SLP-1, SLP-4, SCG-22, H-6, Andares e Yunguyo). Duas cultivares de espécies diferentes de lupinos, *Lupinus albus* (tremoço branco) e *Lupinus angustifolius* (tremoço azul lapar 24), foram obtidas do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). Como no caso das cultivares de feijão, as sementes de lupino foram armazenadas em câmara fria (4 °C) após sua colheita e analisadas num período não superior a dois anos. As frações das sementes (casca, cotilédone e hipocótilo) foram separadas manualmente, moídas sob refrigeração num moinho modelo IKA WORKS, INC (Willmington, NC, E.U.A) até a obtenção de uma farinha com diâmetro de partícula de 60 mesh (0,250 mm) e armazenadas a – 18 °C. A porcentagem de contribuição de cada fração analisada respeito ao peso total da semente de lupino foi muito similar entre as cultivares da espécie *L. mutabilis* (9-10%, 83-85% e 5,8-6.1% para a casca, cotilédone e hipocótilo, respectivamente). Maiores porcentagens de casca foram obtidos para o *L. albus* (18%, 79% e 3% para a casca, cotilédone e hipocótilo, respectivamente) e o *L. angustifolius* (25%, 70% e 5% para a casca, cotilédone e hipocótilo, respectivamente), devido ao maior tamanho das sementes.

Figura 5. Amostras de lupinos avaliadas

4.1.2 Reagentes

Os padrões de quercetina, caempferol, miricetina, genisteína, catequina, ácido clorogênico, ácido sinápico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, o DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), a vanilina e o reagente de Folin-Ciocalteu, foram obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO); o padrão de cianidina da Extrasynthese (Genay Cedex, France), e o Trolox (hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) da Aldrich (Milwaukee, WI). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, ou grau cromatográfico quando necessário.

4.1.3 Métodos

4.1.3.1 Extração e quantificação de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão

a) Extração

As extrações foram realizadas em duplicata e de acordo com o método de ARABBI *et al.* (2004), com algumas modificações, descritas a seguir. As amostras de casca e cotilédone foram extraídas com agitador e barra magnética por 2 horas a 4 °C na proporção 1:20 (m/v) com metanol/água (70:30) ou metanol/água/ácido acético (70:30:5) (amostras com antocianinas). Os extratos foram filtrados sob pressão reduzida através de papel de filtro (Whatman No. 1), evaporados em vácuo a 40 °C até aproximadamente 6 mL em rotaevaporador (Rotavapor® RE 120 – Büchi, Flavil, Suíça).

b) Extração em fase sólida

O volume dos extratos obtidos das cascas foi ajustado com água deionizada para 10 mL e uma alíquota de 1–6 mL (dependendo das concentrações de flavonóides ou ácidos fenólicos na amostra) foi passada em coluna de 1 g de poliamida SC6 (Macherey-Nagel GmbH and Co., Düren, Alemanha), preparada em seringas próprias de 6 mL (HPLC Technology, Hertforshire, Reino Unido). No caso das amostras de cotilédone, os extratos evaporados foram resuspendidos com 10 mL de água deionizada aproximadamente e o volume total foi passado em coluna

de poliamida, como explicado anteriormente. A coluna foi previamente pré-acondicionada pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água deionizada.

Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides e ácidos fenólicos foi realizada com 50 mL de metanol seguidos por 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5), utilizando-se manifold Visiprep 24 DL da Supelco (Bellefonte, E.U.A.). Os eluatos obtidos foram secos completamente em rotaevaporador (Rotavapor® RE 120 – Büchi, Flavil, Suíça), os resíduos foram resuspendidos em 1 mL de metanol HPLC, ou 1 mL de metanol/ácido acético (95:5) para as frações que continham antocianinas, e filtrados a seguir, utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (politetrafluoroetileno) (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 µm de poro.

c) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A identificação e quantificação dos flavonóides e ácidos fenólicos foi realizada em coluna de fase reversa C₁₈ (250 x 4,6 mm, d.i.), 5µ, Prodigy ODS3 (Phenomenex Ltd., Torrance, CA). O cromatógrafo utilizado foi da Hewlett Packard (Palo Alto, E.U.A.) série 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), monitorado pelo software ChemStation. As fases móveis usadas foram: (A) água/tetrahidrofurano/ácido trifluoroacético (98:2:0,1) e (B) acetonitrila, e o gradiente de eluição para as frações metanólicas foi o mesmo utilizado por ARABBI *et al.* (2004). No caso das frações metanol:amônia, o gradiente de eluição começou de 10% até 90% de solvente B num período de 35 min a um fluxo de 1 mL/min. A concentração do solvente B alcançou 20% de 0 a 15 min, logo 50% após 5 min e 90% após mais 5 min, para terminar depois de 10 min na mesma concentração inicial de solvente B (10%).

Os eluatos foram monitorados a 270, 328, 370 e 525 nm e as amostras foram injetadas por duplicata. A calibração foi feita através da injeção dos padrões em triplicata em cinco diferentes concentrações ($R^2 = 0,999$). A identificação dos picos foi realizada comparando-se os tempos de retenção e os espectros obtidos com os dos padrões usados na calibração e a data de espectros da biblioteca. Co-

cromatografia foi aplicada quando necessário. No caso dos glicosídeos de quercetina e caempferol, os resultados foram expressos como mg de aglicona, as antocianinas foram expressas como cianidina, os ácidos fenólicos (clorogênico, sinápico, *p*-cumárico e ferúlico), e a catequina e miricetina foram expressos como mg do padrão respectivo. A quantificação dos derivados de ácidos hidroxicinâmicos foi realizada considerando o ácido clorogênico como o padrão de referência para os picos detectados a 328 nm com características espectrais similares a do ácido clorogênico, mas com diferentes tempos de retenção (as áreas abaixo as curvas foram combinadas para obter um valor só). Os resultados foram expressos por 100 g de amostra em base úmida (b.u.)

4.1.3.2 Extração e quantificação de isoflavonas de lupino

a) Extração

A extração das amostras foi realizada em duplicata por agitação mecânica por 2 horas a 4 °C com metanol/água (70:30) na proporção 1:20 (m/v) de acordo com GENOVESE *et al.* (2005), com algumas modificações, dependendo da fração de lupino a ser analisada (Figura 6). Uma etapa de hidrólise foi incluída para facilitar a identificação e quantificação de isoflavonas como agliconas. Porém, a hidrólise não permitiu uma boa separação dos picos de isoflavonas após a análise por CLAE nas amostras de cotilédone. Portanto, não foi aplicada a hidrólise no cotilédone, e as isoflavonas nesse caso foram quantificadas como glicosiladas.

Figura 6. Diagrama de fluxo do procedimento de extração de isoflavonas das frações de lupino.

- (a) Coluna de poliamida (1 g) SC6 (Macherey-Nagel and Co., Düren, Germany); pré-acondicionamento com 20 mL de methanol e 60 mL de água destilada; eluição da fração cotilédone: 50 mL de metanol e 50 mL de metanol/amônia (99,5:0,5).
 (b) Filtros de politetrafluoroetileno.
 (c) Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

b) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras foram injetadas em duplicata, sendo que as características da coluna e do equipamento foram iguais às utilizadas para as amostras de feijão (item 4.3.1.3). As fases móveis usadas foram: A, água/acetonitrila/ácido acético (95:5:0,1) e B, acetonitrila/ácido acético (99,9:0,1). Diferentes gradientes de eluição foram testados com a finalidade de melhorar a resolução dos cromatogramas e a separação dos picos. Os gradientes finais de eluição variaram de acordo com a fração de lupino a ser avaliada (Tabela 2).

Tabela 2. Gradientes de eluição usados na determinação de isoflavonas das frações de lupino.

Fração de lupino	Tempo (min)	% solvente B (*)
<ul style="list-style-type: none"> • Casca • Cotilédone (fração metanólica) 	0	10
	10	14
	20	17
	30	60
	33	60
	35	10
<ul style="list-style-type: none"> • Hipocótilo • Cotilédone (fração metanol:amônia) 	0	15
	20	40
	30	80
	33	80
	35	15

(*) Acetonitrila/ácido acético (99,9:0,1).

Os eluatos foram monitorados a 255 e 320 nm e a calibração foi feita com padrão de genisteína injetado em triplicata em cinco diferentes concentrações ($R^2 = 0,999$). A identificação dos picos foi feita a partir dos tempos de retenção e do espectro obtido. Os resultados foram expressos como mg de genisteína/100 g em base úmida (b.u.).

4.1.3.3 Extração para a determinação de fenólicos totais, taninos e capacidade antioxidante

Um grama de amostra (frações de feijão ou lupino) foi extraída com 20 mL de metanol/água (70:30) ou metanol/água/ácido acético (70:30:5) (amostras com antocianinas) por 2 horas a 4 °C e centrifugado a 10000 *g* por 10 min. Os sobrenadantes foram armazenados a -18 °C até análise posterior. Todas as extrações foram feitas em duplicata e as análises subseqüentes em triplicata.

4.1.3.4 Determinação de fenólicos totais

A determinação foi realizada de acordo com ZIELINSKI & KOZLOWSKA (2000) modificado por GENOVESE *et al.* (2003). 0,25 mL dos extratos obtidos acima, ou da diluição adequada dos mesmos, foram adicionados a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min à temperatura ambiente, adicionaram-se 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37 °C durante 30 min. As absorbâncias foram determinadas a 750 nm usando um espectrofotômetro modelo Ultrospec 2000 UV/Visível (Amersham Biosciences, Cambridge, UK). A catequina foi usada como padrão de referência e os resultados foram expressos como mg equivalentes de catequina/g de amostra em base úmida (b.u.) para os feijões e como mg equivalentes de catequina/100 g em b.u para os lupinos.

4.1.3.5 Determinação de taninos condensados

A determinação de taninos condensados foi realizada utilizando-se o método da vanilina-HCl (PRICE *et al.*, 1978). Os resultados foram expressos como mg equivalentes de catequina/g de amostra em base úmida (b.u.). Com a finalidade de corrigir qualquer interferência dos pigmentos naturais contidos nos extratos das cascas, um branco foi preparado submetendo o extrato original às mesmas condições da reação mas sem o reagente de vanilina.

4.1.3.6 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de seqüestro de radicais livres do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; modificado por DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante (presente nas amostras) para um radical livre, o DPPH• (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 50 µL do extrato diluído ou não e 250 µL de DPPH• (0.5 mM) e depois de 25 min de reação as leituras das absorbâncias foram realizadas a 517 nm em espectrofotômetro de microplaca (Benchmark Plus, BioRad, Hercules, CA). Utilizou-se uma solução de Trolox como padrão a diferentes concentrações e metanol para o grupo controle. A capacidade antioxidante foi expressa como µmoles de equivalentes de Trolox/g de amostra em base úmida (b.u.) para os feijões e como µmoles de equivalentes de Trolox/100 g b.u. para os lupinos.

4.1.3.7 Determinação de umidade

A umidade das cultivares de feijão selecionadas para a seguinte fase do trabalho referente à avaliação do efeito do processamento térmico, foi realizada em triplicata de acordo à metodologia da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) (2000, 945.38), mediante secagem de 2 g de amostra em estufa (Precision Scientific, Woinchester, VA) calibrada a $100 \pm 0,5$ °C, até obtenção de peso constante.

4.1.3.8 Avaliação do efeito do processamento térmico nas cultivares selecionadas de feijão.

Após a análise dos resultados obtidos para as diversas cultivares de feijão avaliadas, seleccionaram-se as cultivares com maior teor de determinados compostos fenólicos e procedeu-se à avaliação do efeito de diferentes tipos de tratamento térmico sobre os teores e perfis de compostos fenólicos, fenólicos

totais, taninos condensados e capacidade antioxidante. Os tratamentos foram aplicados simulando os diversos procedimentos existentes para o cozimento do feijão. O desenho experimental (Figura 7) correspondeu a um esquema fatorial 2^3 (8 experimentos) onde foram avaliados 3 fatores, sendo que cada fator teve 2 níveis de variação como indicado na Tabela 3.

Figura 7. Desenho experimental para a avaliação do efeito do processamento térmico nos teores e perfis de compostos fenólicos, fenólicos totais, taninos condensados e capacidade antioxidante das cultivares de feijão selecionadas.

Tabela 3. Fatores e níveis avaliados no esquema fatorial 2³

Fator	Nível
1. Maceração prévia ao cozimento	1. com maceração 2. sem maceração
2. Temperatura de cozimento	1. 100 °C 2. 121 °C
3. Drenagem após o cozimento	1. com drenagem 2. sem drenagem

O cozimento a 121 °C foi realizado utilizando uma autoclave vertical modelo 103 (FABBE-PRIMAR, Brasil). Os experimentos foram realizados em duplicata e a determinação do teor de compostos fenólicos, fenólicos totais, taninos condensáveis e capacidade antioxidante foi realizada de acordo ao exposto anteriormente nos itens 4.1.3.1, 4.1.3.3, 4.1.3.4, 4.1.3.5 e 4.1.3.6. As análises foram feitas no feijão inteiro (cru e cozido) e os resultados foram expressos em base seca (b.s.).

4.1.3.9 Determinação do tempo de cozimento do feijão

O tempo de cocção do feijão (com e sem maceração prévia) a 100 °C foi obtido utilizando-se o cozedor tipo Mattson (MATTSON, 1946). O teste foi realizado em triplicata, 25 sementes de feijão foram utilizadas para cada determinação. As sementes foram dispostas no cozedor e mergulhadas em água fervente. O tempo de cocção em cada determinação correspondeu ao tempo gasto para que 50%+1 das hastes pesando 89,9 g caíssem perfurando as sementes. A média entre as três determinações foi calculada.

Vários testes foram realizados para calcular o tempo de cozimento do feijão a 121 °C. Nesse caso, considerou-se o tempo necessário para conseguir a mesma textura final do feijão cozido a 100 °C. As sementes cozidas de feijão (25) foram colocadas dentro de potes de plástico e esfriadas a temperatura ambiente pelo menos uma hora antes da análise de textura. A firmeza ou textura de cada semente cozida foi determinada utilizando um texturômetro digital TAXT2-TEXTURE ANALYZER (Stable Microsystems, Ltd., Surrey, UK), com célula de

carga de 25 kg e célula Kramer de corte-compressão. A velocidade de corte foi calibrada a 1 mm/s e a máxima força necessária no processo de corte (pico máximo) foi considerada como indicador do grau de textura do feijão cozido. A média de 25 determinações foi calculada e os resultados foram expressos como g força. O procedimento foi realizado em duplicata.

4.1.3.10 Análise estatística

Os resultados da CLAE (n=4) e das análises espectrofotométricas (n=6) foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (1-way ou 3-way para os esquemas fatoriais), a comparação de médias foi realizada pelo método de Tukey ($p < 0.05$), as correlações de Pearson e o valor dos efeitos dos tratamentos (esquema fatorial) foram calculados de acordo com o programa Statistica versão 5.0 (StatSoft, Tulsa, E.U.A.).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Compostos fenólicos do feijão

4.2.1.1 Casca

Flavonóides e ácidos fenólicos

As Figuras 8 e 9 mostram os perfis cromatográficos típicos das cascas de feijão procedentes de duas cultivares de cores diferentes (Grupo A: preto e grupo D: marrom claro com listras marrons, Tabela 1).

Os flavonóides mais comuns detectados por CLAE em quase todas as amostras (com exceção das cultivares Ouro branco, IPA-6 e Marfim) foram os glicosídeos de flavonóis, tais como derivados de caempferol e quercetina, em concordância com estudos publicados por vários pesquisadores (DIAZ-BATALLA *et al.*, 2006; ROMANI *et al.*, 2004, APARICIO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2005a; ESPINOSA-ALONSO *et al.*, 2006). Não obstante, a distribuição desses compostos nos eluatos metanólicos foi bastante variável dependendo da cor da casca. No caso das amostras do grupo de cor de casca preta, flavonóides como antocianinas, e derivados de quercetina e caempferol concentraram-se principalmente na fração metanólica (flavonóides neutros), e só uma pequena parte dos glicosídeos de quercetina e caempferol foi eluída na fração metanol:amônia (flavonóides ácidos) (Figura 8).

Figura 8. Cromatogramas dos glicosídeos de flavonóides neutros (A e B) e ácidos (C) extraídos da casca de feijão preto (Grupo A) FT Nobre. A: antocianinas; GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol.

Figura 9. Cromatogramas dos glicosídeos de flavonóides neutros (A) e ácidos (B) extraídos de casca de feijão cultivar BRS Tropical (8202) (Grupo D). GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; C: caempferol como aglicona.

Uma tendência diferente foi observada no grupo dos feijões tipo carioca (Grupo D). Neste caso os flavonóis majoritários presentes tanto nas frações metanol e metanol:amônia foram os glicosídeos de caempferol, e só uma pequena quantidade de quercetina foi detectada na fração metanólica.

Apesar da literatura indicar que os flavonóides encontram-se sobretudo na forma glicosilada, as amostras dos grupos B, D, E e a cultivar Vereda apresentaram uma pequena fração de caempferol na forma aglicona em ambos os extratos metanólicos. ROMANI *et al.* (2004) detectaram um pico de caempferol aglicona num extrato hidroalcolico de *P. vulgaris* cv. Zolfino, e BRAVO (1998)

relatou que os flavonóides podem ocorrer ocasionalmente em plantas na forma aglicona, embora os derivados glicosilados sejam os mais comuns.

Atualmente, os pesquisadores aceitam o fato de que os compostos responsáveis pela coloração da casca do feijão são os flavonóides (BENINGER & HOSFIELD, 1998). Além disso, a grande variedade de tipos e cores na casca do feijão é controlada por um grupo de genes bem definidos (nas características da casca: *T*, *Z*, *L*, *J*, *Bip*, e *Ana*; na cor: *P*, *C*, *R*, *J*, *D*, *G*, *B*, *V*, e *Rk*), os quais parecem regular as vias da biossíntese dos flavonóis e antocianinas (MCCLEAN *et al.*, 2002).

De acordo com a Tabela 4, podem-se fazer algumas observações interessantes a respeito dos diferentes perfis de compostos fenólicos encontrados nas cascas de feijão. Em geral, dentro do mesmo grupo de cor de casca, todos os perfis de flavonóides foram similares, o que poderia caracterizar e diferenciar cada grupo de cor, dependendo de seu perfil de fenólicos. Nesse sentido, os grupos dos feijões pretos e vermelhos se caracterizaram por conter antocianinas.

Os derivados de quercetina concentraram-se majoritariamente nas cascas pretas e vermelhas em relação às cascas dos grupos D e E (cultivares marrons). Contrariamente, estes últimos grupos, o grupo B, e as cascas das cultivares Vereda e Canario Centenário foram mais ricos em glicosídeos de caempferol. Por outro lado, as cascas brancas das cultivares Ouro Branco e INIA-6 apresentaram ácidos fenólicos, porém estas cultivares foram muito pobres em glicosídeos de caempferol e não foram detectados derivados de quercetina. A cultivar peruana Pavita Molinera foi a única casca que apresentou o flavonol miricetina, além dos flavonóis típicos (derivados de quercetina e caempferol).

Observou-se um perfil diferente para as cultivares do grupo G (IPA-6 e Marfim), as quais apresentaram o flavanol catequina e ácidos fenólicos como ácido clorogênico e outros ácidos hidroxicinâmicos.

Tabela 4. Flavonóides e ácidos fenólicos presentes em casca de feijão de cultivares brasileiras e peruanas^a

Cultivar	Cor	FLAVONÓIDES (mg/100 g amostra em base úmida)					ÁCIDOS FENÓLICOS (mg/100 g amostra em base úmida)			
		A	GQ	GC	M	CAT	Total	AC	AH	Total
FT Nobre	A	553 ± 7 a	50 ± 1 e	8.1 ± 0.3 i	n.d ^b	n.d	611 ± 7 c	n.d	n.d	n.d
BRS Triunfo (7762)	A	334 ± 21 c	57 ± 2 d	12 ± 1 i	n.d	n.d	403 ± 23 e	n.d	n.d	n.d
BRS Campeiro	A	265 ± 2 d	29 ± 2 g	12 ± 1 i	n.d	n.d	306 ± 24 g	n.d	n.d	n.d
Diamante Negro	A	429 ± 19 b	69 ± 3 b	11.7 ± 0.5 i	n.d	n.d	509 ± 22 d	n.d	n.d	n.d
BRS Grafite	A	558 ± 7 a	69 ± 1 b	14.3 ± 0.1 i	n.d	n.d	642 ± 6 b	n.d	n.d	n.d
BRS Valente	A	450 ± 45 b	61 ± 5 c	9.8 ± 0.4 i	n.d	n.d	521 ± 49 d	n.d	n.d	n.d
Uirapuru	A	321 ± 6 c	45 ± 1 f	5.5 ± 0.2 i	n.d	n.d	371 ± 7 f	n.d	n.d	n.d
BRS Timbó	B	48 ± 2 e	95 ± 4 a	166 ± 6 e	n.d	n.d	308 ± 13 g	n.d	n.d	n.d
CNFRX (7866)	B	16 ± 1 f	29 ± 1 g	97 ± 2 fg	n.d	n.d	142 ± 4 h	n.d	n.d	n.d
BRS Radiante	C	1.79 ± 0.02 f	0.50 ± 0.02 k	1.11 ± 0.01 i	n.d	n.d	3.40 ± 0.04 k	n.d	n.d	n.d
Irai	C	n.d	0.75 ± 0.02 k	1.2 ± 0.1 i	n.d	n.d	2.0 ± 0.1 k	n.d	n.d	n.d
BRS Tropical (8202)	D	n.d	3.1 ± 0.3 k	62 ± 1 h	n.d	n.d	65 ± 1 j	n.d	n.d	n.d
Pérola	D	n.d	1.2 ± 0.1 k	54.6 ± 0.4 h	n.d	n.d	55.8 ± 0.4 j	n.d	n.d	n.d
BRS Requite	D	n.d	1.9 ± 0.2 k	100 ± 5 fg	n.d	n.d	102 ± 5 i	n.d	n.d	n.d
Talismã	D	n.d	1.09 ± 0.02 k	50.4 ± 0.5 h	n.d	n.d	51.5 ± 0.5 j	n.d	n.d	n.d
Magnífico	D	n.d	1.8 ± 0.1 k	74 ± 2 gh	n.d	n.d	76 ± 3 ij	n.d	n.d	n.d
Carloca	D	n.d	1.6 ± 0.1 k	78 ± 1 fgh	n.d	n.d	79 ± 1 ij	n.d	n.d	n.d
Iapar 81	D	n.d	1.25 ± 0.01 k	106 ± 1 f	n.d	n.d	108 ± 1 i	n.d	n.d	n.d
BRS Pontal	D	n.d	1.2 ± 0.01 k	81 ± 1 fgh	n.d	n.d	82 ± 1 ij	n.d	n.d	n.d
Jalo Precoce	E	n.d	14.6 ± 0.5 i	750 ± 49 a	n.d	n.d	765 ± 49 a	n.d	n.d	n.d
Jalo EEP 558	E	n.d	15 ± 1 i	582 ± 12 b	n.d	n.d	597 ± 12 c	n.d	n.d	n.d
BRS Vereda	F	n.d	15 ± 1 i	301 ± 1 d	n.d	n.d	316 ± 10 g	n.d	n.d	n.d
IPA-6	G	n.d	n.d	n.d	n.d	21 ± 1 a	21 ± 1 k	4.47 ± 0.04 b	12.2 ± 0.2 b	16.6 ± 0.2 b
Marfim	G	n.d	n.d	n.d	n.d	16 ± 1 b	16 ± 1 k	2.8 ± 0.2 c	2.3 ± 0.2 d	5.1 ± 0.4 d
Ouro Branco	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5.6 ± 0.3 a	14 ± 1 a	20 ± 1 a
INIA-6	H	n.d	n.d	0.80 ± 0.04 i	n.d	n.d	0.80 ± 0.04 k	n.d	6.3 ± 0.1 c	6.3 ± 0.1 c
Canário centenário	I	n.d	22 ± 1 h	334 ± 15 c	n.d	n.d	356 ± 16 f	n.d	n.d	n.d
Pavita molinera	J	n.d	5.8 ± 0.3 j	6.0 ± 0.3 i	4.4 ± 0.2	n.d	16 ± 1 k	n.d	0.92 ± 0.04 e	0.92 ± 0.04 e

^a Os resultados são médias ± DP. n.d: não detectado. A: antocianinas; GO: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; M: miricetina; CAT: catequina; AC: ácido clorogênico; AH: ácidos hidroxicinnâmicos. Cor A: preta; B: vermelha; C: marrom clara com listras vermelhas; D: marrom clara com listras marrons; E: marrom amarelada; F: marrom-rosa; G: marrom-rosa; H: branca; I: amarela; J: branca com pontos pretos. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Quantitativamente, os grupos de cascas avaliadas mostraram uma elevada variabilidade nos teores de compostos fenólicos. Os flavonóides totais variaram entre 0,8 a 765 mg/100 g de casca ou entre 0,07 a 69,3 mg/100 g de grão inteiro (considerando que a fração da casca em média representa $9,1 \pm 0,6$ % do total do grão), quantidades maiores que as reportadas por ESPINOSA-ALONSO *et al.* (2006), HEMPEL & BÖHM (1996) e PRICE *et al.* (1998), e similar aos resultados obtidos por ROMANI *et al.* (2004) em cultivares procedentes da Itália.

Adicionalmente, houve diferenças significantes nos conteúdos de flavonóides específicos dentro de cada grupo de cor. As cascas pretas (grupo A) apresentaram uma alta concentração de antocianinas totais que variaram entre 265 e 558 mg/100 g de amostra (expresso como cianidina). Alguns autores reportaram altos níveis de antocianinas totais na casca de feijão preto, 1010 a 1810 mg/100 g de casca em cultivares Mexicanas (SALINAS-MORENO *et al.*, 2005) e 2370 mg/100 g de casca de uma cultivar procedente de uma estação experimental nos Estados Unidos (TAKEOKA *et al.*, 1997). Porém, estes valores não podem ser comparáveis aos obtidos aqui, já que as antocianinas totais foram determinadas por métodos espectrofotométricos. Os resultados do presente trabalho têm mais concordância com aqueles obtidos por CHOUNG *et al.* (2003) e ESPINOSA-ALONSO *et al.* (2006), que obtiveram faixas entre 214 e 278 mg, e 212 a 3788 mg/100 g de casca, respectivamente, utilizando CLAE para a quantificação de antocianinas totais.

As cascas com o maior conteúdo de antocianinas ($p < 0,05$) foram as procedentes das cultivares FT Nobre (553 ± 7 mg/100 g) e BRS Grafite (558 ± 7 mg/100 g). Neste mesmo grupo, os teores de glicosídeos de quercetina variaram entre 29 até 69 mg/100 g, enquanto não houve diferença significativa entre o conteúdo dos glicosídeos de caempferol.

O conteúdo de antocianinas no grupo das cascas vermelhas (B) foi menor (16 – 48 mg/100 g amostra), quando comparado com os teores obtidos no grupo das cascas pretas; no entanto, os teores de glicosídeos de caempferol (97-166 mg/100g) e quercetina (29–95 mg/100 g) foram significativamente maiores. A

cultivar BRS Timbó mostrou o maior conteúdo de glicosídeos de quercetina (95 ± 4 mg/100 g) ($p < 0,05$) entre todas as amostras avaliadas.

Uma grande variabilidade (entre 50,4 até 106 mg/100 g) foi observada entre os valores dos derivados de caempferol do grupo das cascas marrons (D); contrariamente, os níveis dos derivados de quercetina não apresentaram diferenças significativas entre si.

Convém ressaltar o conteúdo considerável de glicosídeos de caempferol apresentado pelas cascas das cultivares Jalo Precoce e Jalo EEP (750 ± 49 mg e 582 ± 12 mg/100 g, respectivamente), ao contrário das cascas do grupo C que exibiram um baixo teor de flavonóis.

Por outro lado, no grupo G não foram detectados flavonóis mas sim um baixo teor de ácidos fenólicos ($5,1 \pm 0,4$ mg a $16,6 \pm 0,2$ mg/100 g expressos como ácido clorogênico).

Entre as cultivares peruanas, a casca amarela procedente da cultivar Canario Centenário destacou-se por seu alto teor de glicosídeos de caempferol (334 ± 15 mg/100 g). BENINGER & HOSFIELD (1998) encontraram um alto teor de dois tipos de glicosídeos de caempferol (108 mg/100 g de feijão inteiro em base úmida) em um tipo novo de feijão “manteca” com casca amarela, e seus dados indicaram que esses flavonóis seriam os responsáveis pela cor da casca.

Fenólicos totais, taninos condensados e capacidade antioxidante

Importantes diferenças observaram-se nos teores de fenólicos totais, taninos condensáveis e capacidade antioxidante dos diferentes grupos de casca de feijão, como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5. Fenólicos totais, taninos condensados e capacidade antioxidante da casca de feijão de cultivares brasileiras e peruanas^a.

Cultivar	Cor	Fenólicos totais ^b	Taninos ^c	Capacidade antioxidante ^d
FT Nobre	A	65 ± 1 ef	288 ± 13 h	296 ± 14 ij
BRS Triunfo (7762)	A	60 ± 1 hij	373 ± 14 d	309 ± 3 ghij
BRS Campeiro	A	49 ± 1 m	263 ± 7 i	249 ± 9 k
Diamante Negro	A	51 ± 2 lm	222 ± 17 k	252 ± 15 k
BRS Grafite	A	73 ± 1 c	369 ± 8 d	327 ± 18 g
BRS Valente	A	62 ± 1 ghi	216 ± 6 k	303 ± 10 hij
Uirapuru	A	63 ± 1 fgh	304 ± 12 g	291 ± 14 j
BRS Timbó	B	64 ± 3 efg	319 ± 11 f	147 ± 5 m
CNFRX (7866)	B	76 ± 2 b	435 ± 15 a	198 ± 12 l
BRS Radiante	C	59 ± 2 ijk	264 ± 15 i	366 ± 13 f
Irai	C	77 ± 5 b	369 ± 13 d	480 ± 15 b
BRS Tropical (8202)	D	86 ± 1 a	449 ± 7 a	518 ± 22 a
Pérola	D	62 ± 4 ghi	343 ± 8 e	405 ± 18 e
BRS Requite	D	52 ± 1 lm	262 ± 15 i	315 ± 15 gh
Talismã	D	52 ± 1 lm	228 ± 3 k	315 ± 18 gh
Magnífico	D	66 ± 1 e	322 ± 5 f	366 ± 10 f
Carioca	D	57 ± 4 jk	267 ± 10 i	360 ± 9 f
Iapar 81	D	79 ± 1 b	439 ± 11 a	481 ± 6 b
BRS Pontal	D	53 ± 1 l	241 ± 4 j	369 ± 19 f
Jalo Precoce	E	60 ± 3 hi	282 ± 8 h	369 ± 14 f
Jalo EEP 558	E	69 ± 1 d	372 ± 6 d	418 ± 3 e
BRS Vereda	F	74 ± 1 c	416 ± 13 b	458 ± 18 c
IPA-6	G	69 ± 1 d	394 ± 2 c	438 ± 18 d
Marfim	G	57 ± 1 k	315 ± 6 fg	324 ± 8 g
Ouro Branco	H	0.46 ± 0.02 p	n.d	1.05 ± 0.02 o
INIA-6	H	0.87 ± 0.01 p	n.d	1.49 ± 0.01 o
Canario centenario	I	4.9 ± 0.1 o	n.d	6.1 ± 0.1 o
Pavita molinera	J	8.9 ± 0.2 n	11.5 ± 0.1 l	54 ± 1 n

^a Os valores são médias ± DP. ^b mg equivalentes de catequina/g de casca em base úmida. ^c mg equivalentes de catequina/g casca em base úmida. ^d µmoles equivalentes de Trolox/g casca em base úmida. n.d: não detectado. Cor A: preta; B: vermelha; C: marrom clara com listras vermelhas; D: marrom clara com listras marrons; E: marrom amarela; F: marrom rosa; G: marrom clara; H: branca; I: amarela; J: branca com pontos pretos. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O conteúdo de fenólicos totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu variou entre 0,46 e 86 mg equivalentes de catequina/g de casca. As cultivares BRS Tropical (8202) e Iapar 81 (grupo D) apresentaram os maiores teores, 86 ± 1 mg e 79 ± 1 mg equivalentes de catequina/g, respectivamente, enquanto os menores teores corresponderam às cascas brancas das cultivares Ouro branco ($0,46 \pm 0,02$ mg equivalentes de catequina/g) e INIA-6 ($0,87 \pm 0,01$ mg equivalentes de catequina/g).

Em relação aos taninos condensados, os conteúdos variaram significativamente entre 11,5 e 449 mg de equivalentes de catequina/g de casca ou entre 1 e 41 mg equivalentes de catequina/g de feijão inteiro (considerando que a fração da casca representa em média $9,1 \pm 0,6\%$ do total do grão). Neste sentido, GUZMAN-MALDONADO (1996) e DE MEJIA *et al.* (2003) também relataram teores similares em grãos inteiros de feijão Mexicano (7-32,4 mg e 17-38 mg equivalentes de catequina/g, respectivamente). As cascas das cultivares do grupo D, tais como BRS Tropical (8202) e Iapar 81 são as mesmas que apresentaram os maiores teores de fenólicos totais, e tiveram também o maior conteúdo de taninos condensados (449 ± 7 mg e 439 ± 11 mg de equivalentes de catequina/g de casca, respectivamente) ($p < 0,05$), enquanto a casca da cultivar peruana Pavita Molinera foi a que apresentou o menor teor desses compostos ($11,5 \pm 0,1$ mg equivalentes de catequina/g). Não foram detectados taninos condensados nas cascas mais claras, como as brancas e amarelas.

Dependendo do grupo de cor, a variabilidade dos teores de fenólicos totais e taninos condensados foi moderada; já diferenças mais significantes foram observadas entre os valores de capacidade antioxidante das cascas. Diferentes conclusões têm sido relatadas a respeito da relação entre os teores de taninos condensados e a cor da casca do feijão. Assim, ESPINOSA-ALONSO *et al.* (2006) indicaram que os teores de fenólicos totais e taninos condensados em *Phaseolus vulgaris* tendem a aumentar de acordo com a cor mais clara das sementes; contrariamente, BARAMPANA & SIMARD (1993) reportaram que feijões com cor de casca mais clara apresentam baixos conteúdos de taninos, se comparados com aqueles de casca mais escura, como os pretos. Outros autores simplesmente não

encontraram uma correlação significativa entre a cor da casca do feijão e o conteúdo de taninos condensados (GUZMAN-MALDONADO *et al.*, 1996; MA & BLISS, 1978). Apesar desta situação controversa, os resultados do presente trabalho sugerem que certos grupos de cascas como as marrons e as vermelhas tendem a ter maior teor de fenólicos totais e taninos condensados que as cascas pretas, ao contrário, as cascas mais claras como as brancas e amarelas não exibiram conteúdos importantes desses compostos. Além disso, considerando a alta variabilidade observada no teor de taninos condensados dentro de cada grupo de cor de casca, o efeito do tipo de cultivar teria que ser também considerado.

Como antioxidantes, os compostos fenólicos podem proteger os constituintes celulares contra o dano oxidativo e, conseqüentemente, limitar ou reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) associadas com o estresse oxidativo, quer pela ação direta sobre espécies reativas de oxigênio, quer pela estimulação de sistemas de defesa endógenos (SCALBERT *et al.*, 2005b). Com o objetivo de conhecer quais compostos fenólicos estariam associados à capacidade de seqüestro de radicais livres das cascas de feijão, foram calculados os coeficientes de correlação (Tabela 6) relacionando os teores de compostos fenólicos (flavonóides, fenólicos totais, taninos condensados) e a sua capacidade antioxidante.

Tabela 6. Coeficientes de correlação de Pearson para antocianinas, flavonóides, flavonóis, taninos, fenólicos totais e capacidade antioxidante de todas as amostras de casca de feijão avaliadas.

	FVT	FL	GQ	GC	T	FT	CA
A ^a	0.95*	-0.63*	0.10	-0.80*	-0.43*	-0.11	0.82*
FVT ^b		0.67*	0.64*	0.59*	0.14	0.22	0.07
FL ^b			0.09	0.99*	0.07	0.09	0.09
GQ ^b				-0.05	0.12	0.19	-0.17
GC ^b					0.05	0.06	0.11
T ^b						0.97*	0.86*
FT ^b							0.88*

* $p < 0,05$. ^a (n = 36). ^b (n = 118). A: Antocianinas; FVT: flavonóides totais; FL: Flavonóis; GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; T: Taninos condensados; FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante.

Semelhantemente a HEIMLER *et al.*, (2005), nem os flavonóides totais, nem os flavonóis específicos apresentaram correlação com a capacidade antioxidante; já os fenólicos totais e os taninos condensados mostraram uma correlação positiva significativa com a capacidade antioxidante da casca ($r=0.88$ e $r=0.86$, respectivamente). Além disso, os fenólicos totais e os taninos condensados apresentaram também uma correlação altamente significativa ($r=0.97$). Estes resultados sugerem que os principais compostos fenólicos presentes na casca de feijão são os taninos condensados, e que estes polímeros, mais que os flavonóides, seriam os responsáveis pela elevada capacidade antioxidante da casca. HAGERMAN *et al.* (1998) reportaram que os taninos hidrolisáveis e condensados de alto peso molecular mostraram melhor capacidade antioxidante que os fenólicos simples. Trabalhos mais recentes relatam que extratos de taninos obtidos de *Phaseolus vulgaris* foram tão ativos ou ligeiramente mais ativos que os flavonóides puros (BENINGER & HOSFIELD, 2003). Isto poderia estar relacionado com o fato de que uma eventual oxidação dos taninos poderia conduzir a sua oligomerização, através de um acoplamento fenólico com o conseqüente aumento do número de seus sítios ativos, como foi sugerido por BORS & MICHEL (2002).

As cascas com antocianinas (Grupo A e B) apresentaram uma tendência diferente. Neste caso a capacidade antioxidante das cascas mostrou uma correlação positiva maior com os teores de antocianinas que com os conteúdos de taninos condensados e fenólicos totais. Em conseqüência, nas cascas pretas e vermelhas, as antocianinas seriam os principais flavonóides que estariam contribuindo significativamente com sua capacidade antioxidante. Esse poderia ser o motivo pelo qual as cascas do grupo B (vermelhas) foram as únicas que mostraram uma capacidade antioxidante moderada, apesar de seus altos conteúdos de fenólicos totais e taninos condensados. Paralelamente, uma baixa correlação negativa ($r= -0.43$) foi observada entre o conteúdo de antocianinas totais e os taninos condensados, como também foi reportado por ESPINOSA-ALONSO *et al.* (2006).

4.2.1.2 Cotilédone

Flavonóides e ácidos fenólicos

Ao contrário do observado na casca, os perfis cromatográficos dos cotilédones do feijão foram bastante similares para todas as amostras avaliadas, sem mostrar nenhuma relação com a cor da casca (Figuras 10 e 11).

Os únicos compostos fenólicos detectados no cotilédone foram ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxycinâmico, os quais variaram em sua distribuição entre as frações metanólicas. Assim, ácidos fenólicos livres como os ácidos ferúlico, sinápico e clorogênico foram detectados na fração metanólica, enquanto outros ácidos hidroxycinâmicos, possivelmente conjugados, foram eluídos na fração metanol amônia.

Figura 10. Cromatogramas dos ácidos fenólicos extraídos na fração metanol (A) e metanol:amônia (B) de cotilédone de feijão preto (Grupo A) FT Nobre. AC: ácido clorogênico; AH: ácido hidroxycinâmico; AS: ácido sinápico; AF: ácido ferúlico.

Figura 11. Cromatogramas dos ácidos fenólicos extraídos na fração metanol (A) e metanol:amônia (B) de cotilédone de feijão BRS Tropical (8202) (Grupo D). AH: ácido hidroxicinâmico; AS: ácido sinápico; AF: ácido ferúlico.

Como pode ser visto na Tabela 7, quantitativamente, os compostos fenólicos majoritários do cotilédone foram os ácidos hidroxicinâmicos conjugados, entanto que os ácidos fenólicos livres constituíram só uma pequena fração. O ácido ferúlico foi detectado em todas as amostras numa faixa de 0,11 a 0,66 mg/100 g de cotilédone. O ácido clorogênico distribuiu-se principalmente entre os cotilédones procedentes das cultivares pretas e de casca marrom claro (0,17 a 0,45 mg/100 g de cotilédone), enquanto que o ácido sinápico foi detectado só em alguns cotilédones (0,08 a 0,19 mg/100 g de cotilédone), independentemente da cor do feijão.

Os cotilédones das cultivares que mostraram altos teores de derivados de caempferol na casca (Vereda, Canario centenário e o grupo E) foram os únicos que apresentaram glicosídeos de quercetina e caempferol, mas em baixas concentrações.

Tabela 7. Flavonóides e ácidos fenólicos presentes em cotilédones de feijão de cultivares brasileiras e peruanas^a

Cultivar	Cor	FLAVONÓIDES (mg/100 g amostra em base úmida)			ÁCIDOS FENÓLICOS (mg/100 g amostra em base úmida)				
		GQ	GC	Total	AC	AS	AF	AH	total
FT Nobre	A	n.d. ^b	n.d	n.d	0.42 ± 0.05 b	0.11 ± 0.01 e	0.49 ± 0.01 e	39.2 ± 0.4 a	40.2 ± 0.4 a
BRS Triunfo (7762)	A	n.d	n.d	n.d	0.27 ± 0.02 d	n.d	0.11 ± 0.01 q	35.6 ± 0.3 c	35.9 ± 0.3 c
BRS Campeiro	A	n.d	n.d	n.d	0.17 ± 0.01 g	n.d	0.13 ± 0.01 q	20.7 ± 0.5 hi	20.9 ± 0.5 ij
Diamante Negro	A	n.d	n.d	n.d	0.19 ± 0.01 fg	0.14 ± 0.00 c	0.51 ± 0.01 d	28 ± 1 e	29 ± 1 ef
BRS Grafite	A	n.d	n.d	n.d	0.18 ± 0.01 g	n.d	0.11 ± 0.00 q	14 ± 1 m	14 ± 1 m
BRS Valente	A	n.d	n.d	n.d	0.31 ± 0.02 c	n.d	0.66 ± 0.00 a	24.3 ± 0.4 f	25.3 ± 0.4 g
Uirapuru	A	n.d	n.d	n.d	0.22 ± 0.00 ef	n.d	0.47 ± 0.01 f	23.1 ± 0.1 g	23.8 ± 0.1 h
BRS Timbó	B	n.d	n.d	n.d	0.20 ± 0.01 fg	n.d	0.56 ± 0.01 c	19.6 ± 0.9 ijk	20 ± 1 ij
CNFRX (7866)	B	n.d	n.d	n.d	n.d	0.16 ± 0.00 b	0.36 ± 0.01 j	11.1 ± 0.1 o	11.6 ± 0.2 o
BRS Radiante	C	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.19 ± 0.01 no	23 ± 2 g	23 ± 2 h
Irai	C	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.37 ± 0.00 ij	19 ± 1 ijk	20 ± 1 jk
BRS Tropical (8202)	D	n.d	n.d	n.d	n.d	0.09 ± 0.00 g	0.42 ± 0.00 g	32.7 ± 0.4 d	33.2 ± 0.4 d
Pérola	D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.20 ± 0.01 n	22.9 ± 0.3 g	23.1 ± 0.3 h
BRS Requite	D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.15 ± 0.01 p	28.4 ± 0.5 e	28.5 ± 0.5 f
Talismã	D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.16 ± 0.00 p	21 ± 1 h	22 ± 1 i
Magnífico	D	n.d	0.21 ± 0.00 d	0.21 ± 0.00 d	n.d	0.19 ± 0.01 a	0.50 ± 0.02 de	29 ± 1 e	30 ± 1 e
Carioca	D	n.d	n.d	n.d	n.d	0.10 ± 0.01 f	0.22 ± 0.01 m	19 ± 1 jk	19 ± 1 kl
Iapar 81	D	n.d	0.39 ± 0.01 b	0.39 ± 0.01 c	n.d	0.15 ± 0.00 c	0.34 ± 0.00 k	38 ± 1 a	39 ± 1 b
BRS Pontal	D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.18 ± 0.01 o	21 ± 1 hi	21 ± 1 ij
Jalo Precoco	E	0.19 ± 0.01 a	0.75 ± 0.01 a	0.93 ± 0.00 a	n.d	n.d	0.39 ± 0.01 hi	18 ± 1 kl	19 ± 1 kl
Jalo EEP 558	E	0.17 ± 0.00 a	0.30 ± 0.01 c	0.48 ± 0.01 b	n.d	n.d	0.11 ± 0.00 q	11.2 ± 0.2 o	11.3 ± 0.2 o
BRS Vereda	F	n.d	0.21 ± 0.01 d	0.21 ± 0.01 d	0.24 ± 0.00 e	n.d	0.11 ± 0.01 q	29.5 ± 0.3 e	29.9 ± 0.3 ef
IPA-6	G	n.d	n.d	n.d	0.45 ± 0.04 a	0.13 ± 0.00 d	0.47 ± 0.02 f	37.2 ± 0.5 b	38 ± 1 b
Marfim	G	n.d	n.d	n.d	0.30 ± 0.02 c	0.08 ± 0.01 g	0.34 ± 0.02 k	28 ± 1 e	29 ± 1 ef
Ouro Branco	H	n.d	n.d	n.d	0.18 ± 0.01 g	n.d	0.34 ± 0.01 k	17 ± 1 l	18 ± 1 l
INIA-6	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.32 ± 0.01 l	4.5 ± 0.1 p	4.8 ± 0.1 p
Canário centenário	I	n.d	0.19 ± 0.00 e	0.19 ± 0.00 e	n.d	0.13 ± 0.01 d	0.64 ± 0.02 b	20 ± 1 ij	21 ± 1 ij
Pavita molinera	J	n.d	n.d	n.d	0.19 ± 0.02 fg	n.d	0.39 ± 0.01 h	12.6 ± 0.2 n	13.2 ± 0.3 n

^aValores são médias ± DP. n.d: não detectado. GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; AC: ácido clorogênico; AS: ácido sinápico; AF: ácido ferúlico; AH: ácido hidroxicinâmico. Cor A: preta; B: vermelha; C: marrom clara com listras vermelhas; D: marrom clara com listras marrons; E: marrom amarelada; F: marrom-rosa; G: marrom clara; H: branca; I: amarela; J: branca com pontos pretos. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Considerando a literatura até o momento, esta é a primeira vez que se reporta a presença de ácido clorogênico em *Phaseolus vulgaris* L. DIAZ-BATALLA *et al.* (2006) e ESPINOSA-ALONSO *et al.* (2006) detectaram outros ácidos fenólicos sobretudo derivados do ácido benzóico como *p*-hidroxibenzóico, vanílico e sirínico em grãos de feijão inteiro. LUTHRIA & PASTOR-CORRALES (2006), além dos ácidos anteriores, encontraram também ácido caféico em cultivares de feijão preto. As análises dos autores anteriores basearam-se na aplicação de um processo de hidrólise ácida ou básica, o que poderia explicar as diferenças com o presente trabalho, a presença de ácido caféico em cultivares pretas por exemplo, em contraste ao ácido clorogênico detectado nesse estudo.

Embora a cor do feijão não ter, aparentemente, influência significativa sobre os perfis de ácidos fenólicos, os cotilédones dos grupos A e D (de casca preta e marrom, respectivamente) apresentaram maior conteúdo de ácidos fenólicos totais que os cotilédones procedentes das cultivares brancas. Os ácidos fenólicos totais variaram entre 4,8 mg/100 g (INIA-6, cultivar branca) e 40,2 mg/100 g (FT Nobre, cultivar preta), ou entre 4,2 e 35,4 mg/100 g no feijão inteiro (considerando que a fração cotilédone representa em média $88,2 \pm 1,5\%$ do total do grão de feijão), teores maiores do que os relatados por ESPINOSA-ALONSO *et al.* (2006) e semelhantes aos reportados por LUTHRIA & PASTOR-CORRALES (2006).

Fenólicos totais e capacidade antioxidante

Segundo a Tabela 8, os cotilédones apresentaram baixos teores de fenólicos totais (0,42 a 0,90 mg equivalentes de catequina/g de cotilédone) e capacidade antioxidante (0,81 a 2,70 μ moles equivalentes de Trolox/g de cotilédone) quando comparados com os das cascas. Além disso, não foram detectados taninos condensados como também foi observado por GUZMAN-MALDONADO *et al.* (1996).

Tabela 8. Fenólicos totais e Capacidade Antioxidante de cotilédone de feijão de cultivares brasileiras e peruanas^a.

Cultivar	Cor	Fenólicos totais ^b	Capacidade Antioxidante ^c
FT Nobre	A	0.77 ± 0.01 d	2.1 ± 0.1 f
BRS Triunfo (7762)	A	0.81 ± 0.01 c	2.2 ± 0.1 f
BRS Campeiro	A	0.62 ± 0.01 j	1.6 ± 0.1 k
Diamante Negro	A	0.70 ± 0.03 g	1.8 ± 0.1 hij
BRS Grafite	A	0.63 ± 0.01 j	1.87 ± 0.04 ghi
BRS Valente	A	0.72 ± 0.02 f	1.9 ± 0.1 ghi
Uirapuru	A	0.65 ± 0.02 i	1.8 ± 0.1 hij
BRS Timbó	B	0.67 ± 0.02 hi	2.3 ± 0.1 e
CNFRX (7866)	B	0.47 ± 0.00 l	1.8 ± 0.1 ij
BRS Radiante	C	0.68 ± 0.01 gh	2.41 ± 0.02 cde
Irai	C	0.83 ± 0.01 b	2.67 ± 0.04 ab
BRS Tropical (8202)	D	0.81 ± 0.01 c	2.4 ± 0.1 e
Pérola	D	0.74 ± 0.01 e	2.37 ± 0.05 de
BRS Requite	D	0.72 ± 0.01 f	2.4 ± 0.1 de
Talismã	D	0.82 ± 0.01 c	2.7 ± 0.1 a
Magnífico	D	0.83 ± 0.02 bc	2.60 ± 0.15 b
Carioca	D	0.65 ± 0.02 i	2.5 ± 0.1 c
Iapar 81	D	0.90 ± 0.02 a	2.63 ± 0.02 ab
BRS Pontal	D	0.70 ± 0.00 g	2.49 ± 0.15 cd
Jalo Precoce	E	0.74 ± 0.01 e	2.0 ± 0.1 g
Jalo EEP 558	E	0.69 ± 0.01 g	1.7 ± 0.1 j
BRS Vereda	F	0.66 ± 0.01 i	2.38 ± 0.04 de
IPA-6	G	0.66 ± 0.01 i	1.9 ± 0.1 gh
Marfim	G	0.66 ± 0.01 i	2.08 ± 0.04 f
Ouro Branco	H	0.47 ± 0.01 l	1.03 ± 0.04 m
INIA-6	H	0.42 ± 0.01 m	0.81 ± 0.06 n
Canario centenário	I	0.53 ± 0.00 k	1.13 ± 0.03 l
Pavita molinera	J	0.42 ± 0.01 m	0.88 ± 0.02 n

^a Valores são médias ± DP. ^b mg equivalentes de catequina/g cotilédone em base úmida. ^c µmoles equivalentes de Trolox/g cotilédone em base úmida. Cor A: preta; B: vermelha; C: marrom clara com listras vermelhas; D: marrom clara com listras marrons; E: marrom amarela; F: marrom rosa; G: marrom clara; H: branca; I: amarela; J: branca com pontos pretos. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Em geral, a variabilidade no conteúdo de fenólicos totais e na capacidade antioxidante entre as amostras não foi tão significativa como a exibida pelas cascas, no entanto, a variabilidade foi maior para os cotilédones das cultivares branca e amarela, as quais mostraram os menores teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante.

De acordo com os resultados da correlação estatística, observou-se uma correlação positiva moderada ($r=0,66$, $n=112$, $p < 0,05$) entre os teores de ácidos fenólicos totais e o conteúdo de fenólicos totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Esta relação foi mais significativa considerando só os cotilédones das cultivares pretas ($r=0,90$, $n=28$, $p < 0,05$), o que significa que, neste grupo, os compostos fenólicos majoritários seriam os ácidos fenólicos. Além disso, a correlação entre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante foi significativa para todas as amostras ($r=0,84$, $n=112$, $p < 0,05$), enquanto houve uma correlação direta moderada entre os valores de ácidos fenólicos totais e a capacidade antioxidante ($r=0,49$, $n=112$, $p < 0,05$).

4.2.2 Compostos fenólicos do lupino

4.2.2.1 Isoflavonas

Nas figuras 12 e 13 são apresentados os cromatogramas característicos das cascas de lupino das espécies estudadas (*Lupinus mutabilis*, *Lupinus albus* e *Lupinus angustifolius*).

Ao contrário do apresentado para o feijão, no lupino não foram detectados flavonóis. As cascas das cultivares SLP-1, SLP-4 e H-6 (*L. mutabilis*) se caracterizaram por apresentar dois tipos de isoflavonas, a genisteína (G) e outra isoflavona preliminarmente identificada como um derivado da genisteína (DG), já que o espectro no ultravioleta é muito parecido ao da genisteína ($UV\lambda_{\text{max}}$ MEOH nm: 262), mas com a presença de um ombro a 292 nm.

Figura 12. Cromatograma característico da casca de *Lupinus mutabilis* das cultivares SLP-1, SLP-4 e H-6 (amostras hidrolisadas).

Figura 13. Cromatograma característico da casca de *Lupino mutabilis* das cultivares SCG-22, Andares, Yunguyo, *Lupinus albus* e *Lupinus angustifolius* (Azul lapar-24) (amostras hidrolisadas).

Nesse sentido, DINI *et al.* (1998) foram os únicos pesquisadores, até a atualidade, que avaliaram uma amostra de *Lupinus mutabilis* procedente do Peru e identificaram, por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear da semente inteira, uma isoflavona 3'-metoxilada derivada da geristeína à qual denominaram "mutabileína" (Figura 14) e a sua forma glicosilada como "mutabilina"; no entanto, o espectro característico desse composto no UV não foi reportado. TAHARA *et al.* (1984) relataram a presença de uma isoflavona 3'-metoxilada denominada 3'-O-metilorobol (Figura 15) nas folhas de *Lupinus albus*, sendo suas características espectrais no UV ($UV\lambda_{max}$ MEOH nm: 263, 292, 332) similares àsquelas encontradas para a isoflavona (DG) ($UV\lambda_{max}$ MEOH nm: 262, 292, 330) no presente trabalho.

Figura 14. Mutabileína: 5,7 dihidroxi-3'-metoxiisoflavona.

Figura 15. 3' -O-metil orobol: 5,7,4' trihidroxi-3'-metoxiisoflavona.

Observando a semelhança das duas estruturas químicas apresentadas nas figuras 14 e 15, as características do espectro no UV da mutabileína poderiam ser parecidas às correspondentes ao 3'-O-metilorobol, e conseqüentemente às da isoflavona (DG); portanto, os dados apresentados fazem supor que a isoflavona (DG) encontrada no *Lupinus mutabilis* tratar-se-ia da mutabileína.

As cascas de lupino das outras cultivares da espécie *L. mutabilis*, e das espécies *L. albus* e *L. angustifolius* não apresentaram isoflavonas em sua composição, porém foi detectado um pico pequeno de uma flavona (F) não identificada. A tentativa de identificação desse composto como "flavona" foi determinada considerando as características do espectro e a absorbância máxima na região do UV. Possivelmente trata-se de um derivado da apigenina devido à semelhança do seu espectro com esse composto. Além disso, a absorbância máxima no UV das bandas I e II foram a 320 e 270 nm, respectivamente. Essas características espectrais são comuns no grupo das flavonas (MARKHAM, 1982).

A influência da espécie no perfil de isoflavonas foi observada com maior clareza no caso do cotilédone. Assim, os perfis cromatográficos das frações metanol e metanol:amônia foram similares entre as cultivares de *L. mutabilis* (Figura 16), encontrando-se os equivalentes glicosilados da (G), (DG) e (F) (amostras não hidrolisadas).

As espécies *L. albus* e *L. angustifolius* caracterizaram-se por apresentar só um pico da flavona não identificada (a mesma encontrada na casca de acordo com as características espectrais e tempo de retenção), enquanto que não foram detectadas isoflavonas (Figura 17).

Figura 16. Cromatogramas típicos do cotilédone de *Lupinus mutabilis* cultivares SLP-1, SLP-4, H-6, SCG-22, Andares e Yunguyo. **A:** Fração metanol, **B:** Fração metanol:amônia. F: flavona glicosilada não identificada; G: genistina; DG: derivado glicosilado da genisteína (amostras não hidrolisadas).

Figura 17. Cromatogramas típicos do cotilédone de **A:** *Lupinus albus* e **B:** *Lupinus angustifolius* (Azul lapar-24) na fração metanólica. F: flavona glicosilada não identificada (amostras não hidrolisadas).

Similar ao cotilédone, os perfis cromatográficos da fração hipocótilo foram semelhantes para as cultivares da espécie *L. mutabilis* (Figura 18), sendo a genisteína a principal isoflavona detectada. Por outro lado, as espécies *L. albus* e *L. angustifolius* apresentaram um pico significativamente grande da flavona não identificada (F), e só na espécie *L. albus* (tremoço branco) foi detectado um pico pequeno de genisteína (Figura 19). Alguns estudos realizados em *Lupinus albus* L. cv. multolupa, identificaram isoflavonas do tipo genisteína, 2'-hidroxigenisteína, luteona e wighteona em hipocótilos em germinação (BARCELÓ & MUÑOZ, 1989), sugerindo que esses compostos estão relacionados com a regulação do processo de lignificação da parede celular (FERRER *et al.*, 1990).

Figura 18. Cromatograma típico do hipocótilo de *Lupinus mutabilis* cultivares SLP-1, SLP-4, H-6, SCG-22, Andares, Yunguyo. F: flavona não identificada, G: genisteína (amostras hidrolisadas).

Figura 19. Cromatograma típico do hipocótilo de *Lupinus albus* (A) e *Lupinus angustifolius* (B) (Azul lapar-24). F: flavona não identificada, G: genisteína (amostras hidrolisadas).

Em geral, os trabalhos existentes reportam a presença de isoflavonas em partes diferentes da planta de lupino, e essas atuariam como agentes protetores contra a infecção por fungos patogênicos durante o crescimento (FERRER *et al.*, 1990). Nesse sentido, a luteona (uma tetrahidroxiisoflavona) foi identificada em sementes imaturas de *Lupinus luteus* (FUKUI *et al.*, 1973). Outros autores reportaram a presença de genisteína, 2'-hidroxigenisteína e seus derivados glicosilados e prenilados (isoflavonas complexas) em brotos (GAGNON *et al.*, 1992; GAGNON & IBRAHIM, 1997), folhas (TAHARA *et al.* 1984) e vagens (KATAGIRI *et al.*, 2000) de *Lupinus albus* (lupino branco).

De acordo com a literatura, as sementes maduras de *L. albus*, *L. angustifolius* e *L. luteus* normalmente contêm traços de isoflavonas (KATAGIRI *et al.*, 2000; SIRTORI *et al.*, 2004), porém os dados obtidos no presente trabalho mostram que as sementes maduras de *L. mutabilis* procedentes do Peru, apresentam quantidades interessantes de isoflavonas totais (expressas como genisteína) (Tabela 9).

Tabela 9. Conteúdo de isoflavonas na casca, cotilédono e hipocótilo de cultivares peruanas e brasileiras de lupino^a

Espécie	Cultivar	CASCA			COTILÉDONO			HIPOCÓTILO		
		(mg genisteína/100 g b.u.)			(mg genisteína/100 g b.u.)			(mg genisteína/100 g b.u.)		
		DG	G	Total	DG	G	Total	DG	G	Total
1	SLP-1	6,6±0,5 b	3,2±0,3 b	9,8±0,7 b	11,9±0,4 c	6,1±0,1 c	17,9±0,4 c	n.d	1,45±0,07 b	1,45±0,07c
1	SLP-4	6,0±0,5 b	4,0±0,1 a	10,0±0,5 b	11,8±0,4 c	5,7±0,1 d	17,5±0,4 c	n.d	1,3±0,1 bc	1,3±0,1 c
1	H-6	83±1 a	3,9±0,3 a	87±1 a	24,3±0,3 a	6,4±0,1 b	30,8±0,5 a	4,6±0,2	1,50±0,06 b	6,1±0,3 a
1	SCG-22	n.d ^p	n.d	n.d	13,8±0,4 b	5,7±0,1 d	19,5±0,5 b	n.d	1,3±0,1 bc	1,3±0,1 c
1	Andares	n.d	n.d	n.d	9,4±0,3 e	7,0±0,1 a	16,4±0,4 d	n.d	1,5±0,1 b	1,5±0,1 c
1	Yunguyo	n.d	n.d	n.d	10,0±0,2 d	6,0±0,1 c	16,1±0,3 d	n.d	1,27±0,04 c	1,27±0,04c
2	Tremoço branco	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2,0±0,1 a	2,0±0,1 b
3	Azul lapar – 24	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

^a Valores são médias ± DP. n.d: não detectado. Espécie, 1: *Lupinus mutabilis*, 2: *Lupinus albus*, 3: *Lupinus angustifolius*. DG: derivado da genisteína, G: genisteína. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O cotilédone das cultivares de *Lupinus mutabilis* foi a fração que apresentou os maiores teores de isoflavonas totais (16,1 – 30,8 mg/100 g cotilédone b.u.), se comparado com o hipocótilo (1,27 – 6,1 mg/100 g hipocótilo b.u.) e as cascas das cultivares SLP-1 e SLP-4 (9,8 e 10 mg/100 g casca b.u., respectivamente). Uma observação importante é que o derivado da genisteína (DG) foi a isoflavona majoritária nas frações da casca e cotilédone. Além disso, a cultivar H-6 destacou-se pelo alto conteúdo de isoflavonas totais na casca (87 mg/100 g b.u.), cotilédone (30,8 mg/100 g b.u.) e hipocótilo (6,1 mg/100 g b.u.) ($p < 0,05$).

As amostras de *L. albus* (Tremoço branco) e *L. angustifolius* (Tremoço azul lapar-24) não apresentaram isoflavonas, com exceção da fração hipocótilo do tremoço branco, onde só foi detectada uma baixa quantidade de genisteína (2 mg/100 g b.u.).

Considerando as porcentagens de rendimento de cada fração (casca, cotilédone e hipocótilo) em relação ao peso total da semente, é possível calcular o conteúdo de isoflavonas totais no grão inteiro das cultivares de lupino avaliadas (Figura 20). Em geral, a variabilidade nos teores de isoflavonas totais entre as amostras da mesma espécie foi moderada; no entanto, segundo os dados apresentados, a cultivar H-6 foi a que teve o maior conteúdo de isoflavonas totais ($p < 0,05$) (34,8 mg/100 g de grão inteiro b.u.), seguido pelas outras cultivares (13,62 - 16,65 mg/100 g de grão inteiro b.u.).

Os poucos trabalhos com *L. mutabilis* relatam quantidades muito menores que a encontrada no presente estudo. Assim, DINI *et al.* (1998) e MAZUR *et al.* (1998) quantificaram 5,3 mg de mutabileína e mutabilina/100 b.u. e 2,44 mg de genisteína/100 g b.u., respectivamente, no grão inteiro. Já SIRTORI *et al.* (2004) reportaram teores ainda mais baixos de genisteína e genistina (0,56 mg/100 g b.u.) em sementes de *Lupinus albus*.

Figura 20. Conteúdo de isotlavonas totais no grão inteiro de cultivares de lupino. (a-d) Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Embora as quantidades de isotlavonas das cultivares de *L. mutabilis* sejam promissoras, ainda são consideradas moderadas se comparadas com às da soja. Nesse sentido, GENOVESE *et al.* (2005) determinaram uma variação do conteúdo de isotlavonas em cultivares brasileiras entre 57 e 188 mg/100 g b.u., enquanto que WANG *et al.* (2000) reportaram uma faixa entre 116 e 274 mg de isotlavonas/100g b.u. em variedades de soja procedentes de E.U.A.

4.2.2.2 Fenólicos totais, taninos condensados e capacidade antioxidante

Os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante das cultivares de lupino avaliadas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Fenólicos totais e capacidade antioxidante da casca, cotilédone e hipocótilo de cultivares peruanas e brasileiras de lupino^a

Espécie	Cultivar	FENÓLICOS TOTAIS			CAPACIDADE ANTIOXIDANTE		
		(mg equivalentes de catequina/100 g b.u.)			(μmoles equivalentes de Trolox/100 g b.u.)		
		Casca	Cotilédone	Hipocótilo	Casca	Cotilédone	Hipocótilo
1	SLP-1	169±6 d	1196±13 c	1238±23 b	83±6 b	103±3 c	164±6 d
1	SLP-4	284±4 b	1242±29 a	1230±16 bc	75±2 b	95±3 d	157±6 e
1	H-6	449± 6 a	1167±25 d	1325±24 a	720 ± 20 a	160 ± 10 a	480 ± 10 a
1	SCG-22	141±3 e	1221±20 b	1214±10 c	52±3 c	91±5 de	131±2 g
1	Andares	173±1 c	1106±13 e	1140±15 d	39±3 d	89±5 e	137±2 f
1	Yunguyo	137±3 f	1067±28 f	1125±15 d	62±4 c	82±4 g	125±2 g
2	Tremoço branco	102,7±0,5 h	922±13 g	611±5 f	33±2 d	149±4 b	202±6 c
3	Azul-lapar – 24	106±2 g	738±13 h	688±12 e	54±4 c	56±4 f	250±10 b

^a Valores são médias ± DP. Espécie, 1: *Lupinus mutabilis*, 2: *Lupinus albus*, 3: *Lupinus angustifolius*. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Não foram detectados taninos condensados em nenhuma das frações das espécies de lupino analisadas quando a análise da vanilina foi aplicada como no caso do feijão. A esse respeito, LAMPART-SZCZAPA *et al.* (2003) relataram a presença de taninos em *L. albus* e *L. angustifolius*, principalmente nos cotilédones do lupino branco. Adicionalmente, JIMÉNEZ-MARTÍNEZ *et al.* (2001) detectaram taninos (0,31%) em extratos aquosos de sementes de *L. campestris*. Essas diferenças com o presente trabalho podem estar associadas às diferentes metodologias utilizadas nas determinações.

Tanto os teores de fenólicos totais quanto a capacidade antioxidante foram maiores para os cotilédones e hipocótilos, quando comparados aos apresentados pelas cascas. No entanto, a cultivar H-6, além de ter os maiores teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante ($p < 0,05$), apresentou também uma tendência diferente das outras amostras. Neste caso, foi a casca a que mostrou a maior capacidade antioxidante (720 μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.), seguido pelo hipocótilo (480 μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.) e cotilédone (160 μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostras b.u.), sem revelar uma correlação significativa com os teores de fenólicos totais.

Embora não existam ainda referências na literatura sobre o conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante de *Lupinus mutabilis*, estudos feitos em outras espécies de lupino (OOMAH *et al.*, 2006) mostram que a capacidade antioxidante (avaliada pelo método da fotoquimiluminescência) não teve correlação com o conteúdo de fenólicos totais em sementes de *L. angustifolius*. Ao contrário, TSALIKI *et al.* (1999), utilizando o sistema de β -caroteno/ácido linoléico, observaram uma alta correlação entre os teores de fenólicos totais e fosfolípidios com a capacidade antioxidante.

De acordo com os coeficientes de correlação, considerando só as cultivares de *Lupinus mutabilis*, calculados para as três frações da semente (Tabela 11), houve uma correlação positiva significativa ($r > 0,9$) entre os teores de isoflavonas totais e a capacidade antioxidante tanto na casca, cotilédone e hipocótilo. Dessa forma, para o grupo dos lupinos peruanos, as isoflavonas totais

estariam contribuindo significativamente com sua capacidade de seqüestro de radicais livres.

Embora as outras espécies de lupino (branco e azul) tenham apresentado menor teor de fenólicos totais que as espécies de *L. mutabilis*, também mostraram uma capacidade antioxidante significativa, especialmente na fração do hipocótilo. Isto poderia estar relacionado com a presença da flavona (F) como foi indicado anteriormente.

Tabela 11. Coeficientes de correlação para os teores de fenólicos totais, isoflavonas totais e capacidade antioxidante de cultivares de *Lupinus mutabilis*.

FRAÇÃO	Isoflavonas totais vs fenólicos totais	Isoflavonas totais vs capacidade antioxidante	Fenólicos totais vs capacidade antioxidante
CASCA	0,93*	0,99*	0,90*
COTILÉDONE	0,20	0,96*	0,18
HIPOCÓTILO	0,75*	0,99*	0,80*

* $p < 0,05$, $n = 24$

4.2.3 Avaliação do efeito do processamento térmico sobre os perfis e teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante nas cultivares de feijão selecionadas

De acordo com os resultados obtidos no item 4.2.1, as cultivares FT Nobre e Jalo Precoce apresentaram os maiores teores de antocianinas e flavonóis totais, respectivamente. Portanto, essas cultivares foram selecionadas para a segunda parte do trabalho quando foi avaliado o efeito de diferentes tipos de processamento térmico sobre os perfis/teores de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do feijão. As análises foram realizadas no feijão inteiro e foram considerados diferentes fatores relacionados com os métodos tradicionais de cozimento do feijão.

4.2.3.1 Determinação do tempo de tratamento térmico

Tanto o tempo de cocção quanto a textura, aparência e sabor do alimento depois do cozimento são consideradas características importantes de qualidade. O tempo de cozimento é um dos fatores de qualidade mais importante a ser avaliado na cocção das leguminosas (MOSCOSO *et al.*, 1984).

O tempo de cocção a 100 °C foi determinado utilizando o método do cozedor de Mattson; entretanto para os tratamentos a 121 °C, foram realizados vários testes até conseguir a mesma textura que a obtida a 100 °C, sendo que a textura foi determinada com um texturômetro digital. Dessa forma, obtiveram-se resultados mais objetivos que os métodos sensoriais como o método tátil ou com painel sensorial (VINDIOLA *et al.*, 1986).

De acordo com a Tabela 12, o tempo de cozimento necessário para conseguir uma textura aceitável variou de acordo com o tipo de tratamento. Menores tempos de cozimento foram necessários para os tratamentos com maceração prévia ao cozimento quando comparados com os tratamentos sem maceração prévia, enquanto que os tratamentos a 121 °C, tiveram seus tempos de cozimento reduzidos (<10 min.). Tradicionalmente, o feijão é macerado com a finalidade de facilitar o cozimento posterior; a hidratação prévia permite uma transferência de calor mais efetiva no alimento, resultando em menores tempos de processamento (IBARZ *et al.*, 2004). Porém, no presente trabalho foram incluídos tratamentos sem maceração prévia com a finalidade de determinar se a perda de fenólicos antioxidantes é significativa durante essa etapa.

Em geral, os tempos de cozimento foram maiores para a cultivar Jalo Precoce que para a cultivar FT Nobre. Além disso, a textura final medida em g força foi maior na cultivar Jalo Precoce que no feijão preto. Isto pode estar relacionado com diferenças nas características químicas dos carboidratos e as proteínas presentes nessas cultivares (PUJOLA *et al.*, 2007). Similarmente, ROCHA-GUZMAN *et al.* (2007) observaram que diferentes cultivares de feijão precisaram de tempos de cocção significativamente diferentes quando submetidos aos mesmos parâmetros de processamento.

Tabela 12. Determinação do tempo de cozimento para os diferentes tratamentos

Cultivar	Maceração (a)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Textura (g força)
FT nobre	SEM	100	93	578 ± 51
	SEM	121	10	554 ± 65
	COM	100	50	514 ± 59
	COM	121	0 ^(b)	560 ± 10
Jalo Precoce	SEM	100	119	800 ± 50
	SEM	121	8	750 ± 60
	COM	100	58	870 ± 70
	COM	121	0 ^(b)	770 ± 80

(a) Maceração prévia ao cozimento.

(b) A autoclave foi desligada quando a temperatura alcançou 121 °C.

4.2.3.2 Efeito sobre os perfis e teores de flavonóides e ácidos fenólicos

Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores, enquanto que os fatores são denominados como as variáveis independentes ou preditoras, que tiveram seus níveis fixados *a priori* segundo o interesse do pesquisador (RODRIGUES & IEMMA, 2005). Em um esquema fatorial, o valor calculado dos efeitos principais indica quantitativamente a variação causada na resposta quando se percorre todos os níveis desse fator, independentemente dos demais fatores. A vantagem desse tipo de experimento é que, além de permitir conhecer os efeitos causados pelos fatores independentes, também é possível estimar e detectar se a interação de um ou mais fatores é significativa na variável resposta (BOX *et al.*, 1978).

No presente trabalho, os fatores considerados para avaliar o efeito do processamento térmico sobre os compostos fenólicos do feijão foram 3 (temperatura de cozimento, maceração e drenado), sendo que cada fator foi estudado a dois níveis (100 e 121 °C, com e sem maceração prévia, com e sem drenagem posterior, respectivamente). Dessa maneira foi planejado um esquema

fatorial 2^3 com 8 tratamentos ou combinações totais. As variáveis resposta corresponderam aos teores dos diferentes compostos fenólicos quantificados por HPLC-DAD após o tratamento térmico.

A Tabela 13 mostra os teores de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão preto FT Nobre determinados após os diferentes tratamentos e na Tabela 14, são apresentados os valores dos efeitos de cada fator e interação sobre os teores dos compostos fenólicos em estudo assim como o grau de significância estatística de cada efeito ($p < 0,05$).

Em geral, tanto os fatores principais (maceração, temperatura e drenagem) quanto as interações dos fatores influenciaram significativamente e inversamente (sinal negativo) nos teores de flavonóides e ácidos fenólicos. Porém, observando-se a Tabela 14, é também possível conhecer o fator ou interação com maior influência no processo. Para todas as variáveis resposta, o efeito dos fatores “drenagem” e “maceração” foram os que demonstraram a maior influência sobre as médias gerais dos teores de flavonóis e ácidos fenólicos (maiores valores quantitativos). Dessa maneira, para o caso das antocianinas, o valor da média geral foi reduzido em 6,53 mg/100 g (b.s.) quando uma drenagem posterior ao tratamento térmico foi aplicada, independentemente da temperatura, e do macerado antes da cocção.

Tabela 13. Teor de compostos fenólicos (mg/100 g, base seca) do feijão preto inteiro cultivar FT Nobre cru e cozido sob diferentes condições^a

Composto fenólico	Feijão cru ^b	SEM MACERAÇÃO						COM MACERAÇÃO					
		100 °C			121 °C			100 °C			121 °C		
		Drenado	Sem drenar	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Sem drenar
A	37 ± 2	7 ± 1 c	16,9 ± 0,2 a	3,9 ± 0,3 d	10,1 ± 0,1 b	3,0 ± 0,4 de	9,1 ± 0,9 b	2,0 ± 0,1 e	5,9 ± 0,2 c				
GQ	3,0 ± 0,3	2,5 ± 0,3 b	3,6 ± 0,2 a	1,7 ± 0,1 cd	3,8 ± 0,1 a	0,70 ± 0,01 e	1,6 ± 0,1 d	0,80 ± 0,03 e	2,1 ± 0,2 bc				
GC	0,63 ± 0,04	0,6 ± 0,1 b	0,8 ± 0,1 a	0,47 ± 0,04 c	0,83 ± 0,05 a	0,16 ± 0,02 e	0,32 ± 0,02 d	0,19 ± 0,01 e	0,40 ± 0,05 cd				
AF	0,94 ± 0,05	0,8 ± 0,1 c	1,22 ± 0,04 b	0,80 ± 0,03 c	1,7 ± 0,1 a	0,20 ± 0,01 e	0,52 ± 0,03 d	0,24 ± 0,01 e	0,80 ± 0,03 c				
AH	36 ± 4	4 ± 1 c	18 ± 1 a	4,4 ± 0,3 c	16,1 ± 0,5 a	1,6 ± 0,2 d	12 ± 1 b	1,59 ± 0,03 d	13 ± 1 b				
FVT	41 ± 3	10 ± 1 cd	21,3 ± 0,4 a	6,2 ± 0,3 e	14,7 ± 0,2 b	3,9 ± 0,5 f	11 ± 1 c	3,0 ± 0,1 f	8 ± 1 d				
AFT	37 ± 4	5 ± 1 c	19 ± 1 a	5,2 ± 0,3 c	17,7 ± 0,5 a	1,8 ± 0,2 d	13 ± 1 b	1,83 ± 0,02 d	14 ± 1 b				

^a Valores são médias ± DP. ^b Umidade do feijão cru: 9,65 ± 0,14%. A: antocianinas totais; GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; AF: ácido ferúlico; AH: ácidos hidroxicinâmicos; FVT: flavonóides totais; AFT: ácidos fenólicos totais. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 14. Valores dos efeitos calculados sobre os teores de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão inteiro cultivar FT Nobre após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2³ (3 fatores com 2 níveis)

Fator ou interação	A	GQ	GC	AF	AH
Maceração (com e sem)	- 4,45 ± 0,19 *	- 1,61 ± 0,06 *	- 0,41 ± 0,02 *	- 0,68 ± 0,01 *	- 3,62 ± 0,31 *
Temperatura (100 e 121 °C)	- 3,47 ± 0,19 *	0,01 ± 0,06	- 0,001 ± 0,02 NS	0,18 ± 0,01 *	- 0,24 ± 0,31 NS
Drenagem (com e sem)	- 6,53 ± 0,19 *	- 1,35 ± 0,06 *	- 0,22 ± 0,02 *	- 0,53 ± 0,01 *	- 11,76 ± 0,31 *
Maceração x Temperatura	1,36 ± 0,19 *	0,29 ± 0,06 *	0,06 ± 0,02 *	- 0,03 ± 0,01 NS	0,59 ± 0,31 NS
Maceração x Drenagem	1,51 ± 0,19 *	0,25 ± 0,06 *	0,02 ± 0,02 NS	0,10 ± 0,01 *	0,88 ± 0,31 *
Temperatura x Drenagem	1,51 ± 0,19 *	- 0,33 ± 0,06 *	- 0,07 ± 0,02 *	- 0,17 ± 0,01 *	0,33 ± 0,31 NS
Maceração x Temperatura x Drenagem	- 0,43 ± 0,19 *	0,13 ± 0,06 NS	0,05 ± 0,02 *	0,05 ± 0,01 *	- 0,71 ± 0,31 *

*Efeito significativo ($p < 0,05$). NS: não significativo. A: antocianinas totais; GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; AF: ácido ferúlico; AH: ácidos hidroxicinâmicos.

Por outro lado, quando o feijão preto foi cozido com maceração prévia, o valor da média geral do teor de antocianinas diminuiu em 4,45 mg/100 g (b.s.), independentemente dos outros fatores em avaliação. O mesmo poderia ser interpretado no caso dos outros compostos fenólicos, como os glicosídeos de quercetina, caempferol e ácidos fenólicos.

O aumento da temperatura de cozimento de 100 para 121 °C não influenciou significativamente os teores de glicosídeos de quercetina, caempferol e ácidos hidroxicinâmicos, independentemente dos níveis dos outros fatores. Porém, no caso das antocianinas, um aumento da temperatura de cocção de 100 para 121 °C implicou uma redução em 3,47 mg/100 g (b.s.) no valor da média geral. Como indicado anteriormente, os efeitos das interações dos fatores sobre os teores de compostos fenólicos em geral foram negativos, o que significa que a combinação de maiores temperaturas de cozimento, aplicação de uma maceração prévia ou drenagem posterior em conjunto implica também uma perda desses compostos presentes no feijão preto.

A análise de variância permitiu confirmar o exposto anteriormente, além de identificar os tratamentos que permitiram uma melhor retenção dos compostos fenólicos (Tabela 13). Os tratamentos sem maceração prévia ao cozimento e sem drenar logo depois do processo de cocção apresentaram maiores teores de flavonóides e ácidos fenólicos que os tratamentos com maceração e drenado. Entre os tratamentos sem maceração e sem drenagem, não houve diferenças significantes entre os teores de glicosídeos de quercetina, caempferol e ácidos hidroxicinâmicos quando o cozimento foi realizado a 100 ou 121 °C. Porém, a redução nos conteúdos de antocianinas foi significativa após a cocção do feijão preto a 121 °C. A sensibilidade das antocianinas por efeito do tratamento térmico tem sido amplamente reportada na literatura. As antocianinas são inicialmente desglicosiladas para depois serem degradadas em fluoroglucinaldeído (caso da cianidina e pelargonidina), ácido 4-hidroxibenzóico (pelargonidina) e ácido protocatecuico (cianidina), sendo que esses dois últimos compostos correspondem aos resíduos dos anéis A e B, respectivamente (SADILOVA *et al.*, 2006).

Adicionalmente, KLOPOTEK *et al.* (2005), em estudos realizados com morangos submetidos a diferentes tipos de processos industriais, indicaram que o tratamento térmico promove a liberação do cátion flavílio, o qual é posteriormente hidratado até uma base hemiacetálica termossensível e sem cor, causando dessa forma uma redução do conteúdo total de antocianinas.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados dos teores de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão cultivar Jalo Precoce obtidos após a aplicação dos diferentes tratamentos, e a Tabela 16 mostra os valores dos efeitos de cada fator e interação sobre os teores dos compostos fenólicos do feijão Jalo Precoce, assim como o grau de significância estatística de cada efeito ($p < 0,05$).

Similarmente ao observado no feijão preto cultivar FT Nobre, a cultivar Jalo Precoce apresentou as mesmas tendências quanto aos valores dos efeitos principais e interações dos fatores. Em geral, todos os fatores e interações influenciaram significativamente e inversamente os teores de compostos fenólicos (sinal negativo). Tanto o cozimento do feijão com maceração prévia e a aplicação de um drenado após o processo térmico determinaram uma redução nos teores de flavonóides e ácidos fenólicos.

No caso dos glicosídeos de caempferol (o maior flavonóide nessa cultivar), o tratamento térmico com maceração prévia implicou uma diminuição em 18,19 mg/100 g (b.s.) no valor da média geral desse flavonóide, quando comparado com os tratamentos sem maceração. Por outro lado, o valor da média geral dos glicosídeos de caempferol foi reduzido em 16,25 mg/100 g (b.s.) quando o feijão foi cozido e drenado posteriormente, independentemente dos níveis dos outros fatores. Convém ressaltar que a drenagem após o cozimento foi o fator com maior influência nos teores de ácidos hidroxicinâmicos (-12,08) se comparado com o fator “maceração” (- 3,51), o que significa que a perda desses compostos ocorre mais no processo de drenagem após o tratamento térmico que na etapa de macerado prévio ao cozimento.

Tabela 15. Teor de compostos fenólicos (mg/100 g, base seca) do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce cru e cozido sob diferentes condições^a

Composto fenólico	Feijão cru ^b	SEM MACERAÇÃO				COM MACERAÇÃO			
		100 °C		121 °C		100 °C		121 °C	
		Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar
GQ	0,78 ± 0,02	0,84±0,04 b	1,3 ± 0,1 a	0,50±0,02 c	1,2 ± 0,1 a	0,30±0,03 d	0,51±0,01 c	0,21±0,01 d	0,55±0,02 c
GC	30,7 ± 0,2	33,3 ± 0,1 c	48,8 ± 0,1 a	16,3 ± 0,1 f	47,1 ± 0,4 b	13,5 ± 0,3 g	23,4 ± 0,1 d	13,6 ± 0,2 g	22,3 ± 0,1 e
ACu	0,36 ± 0,04	0,33±0,05 b	0,51±0,06a	0,30±0,01 b	0,4 ± 0,1 a	0,05±0,00 d	0,18±0,02 c	0,05±0,00 d	0,27±0,01 b
AF	0,95 ± 0,04	0,90±0,03bc	1,6 ± 0,1 a	0,84±0,01 c	1,57±0,04 a	n.d	0,82±0,01 c	n.d	0,94±0,01 b
AH	23,9 ± 0,1	6,4 ± 0,1 e	19 ± 1 a	8,00±0,05 d	17,8 ± 0,3 b	2,06±0,04 g	15,6 ± 0,4 c	3,1 ± 0,1 f	15,9 ± 0,5 c
FVT	31,5 ± 0,1	34,1 ± 0,1 c	50,1 ± 0,1 a	16,8 ± 0,1 f	48,3 ± 0,4 b	13,8 ± 0,3 g	23,9 ± 0,1 d	13,8 ± 0,2 g	22,8 ± 0,1 e
AFT	25,2 ± 0,1	7,7 ± 0,2 e	21 ± 1 a	9,15±0,03 d	19,8 ± 0,4 b	2,10±0,05 g	16,6 ± 0,4 c	3,1 ± 0,1 f	17,2 ± 0,5 c

^a Valores são médias ± DP.^b Umidade do feijão cru: 11,13 ± 0,08%. n.d: não detectado. GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; ACu: ácido *p*-cumárico; AF: ácido ferúlico; AH: ácidos hidroxicinnâmicos; FVT: flavonóides totais; AFT: ácidos fenólicos totais. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 16. Valores dos efeitos calculados sobre os teores de flavonóides e ácidos fenólicos do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2³ (3 fatores com 2 níveis).

Fator ou interação	GQ	GC	ACu	AF	AH
Maceração (com e sem)	-0,56 ± 0,02 *	-18,19 ± 0,08 *	-0,26 ± 0,01 *	-0,79 ± 0,01 *	-3,51 ± 0,11 *
Temperatura (100 e 121 °C)	-0,11 ± 0,02 *	-4,94 ± 0,08 *	0,001 ± 0,01 NS	-0,002 ± 0,01 NS	0,55 ± 0,11 *
Drenagem (com e sem)	-0,42 ± 0,02 *	-16,25 ± 0,08 *	-0,18 ± 0,01 *	-0,81 ± 0,01 *	-12,10 ± 0,11 *
Maceração x Temperatura	0,09 ± 0,02 *	4,42 ± 0,08 *	0,04 ± 0,01 *	0,06 ± 0,01 *	0,16 ± 0,11 NS
Maceração x Drenagem	0,15 ± 0,02 *	6,90 ± 0,08 *	-0,01 ± 0,01 NS	-0,07 ± 0,01 *	-1,13 ± 0,11 *
Temperatura x Drenagem	-0,10 ± 0,02 *	-3,51 ± 0,08 *	-0,01 ± 0,01 NS	-0,03 ± 0,01 *	0,75 ± 0,11 *
Maceração x Temperatura x Drenagem	0,04 ± 0,02 *	4,13 ± 0,08 *	-0,03 ± 0,01 *	-0,03 ± 0,01 *	-0,42 ± 0,11 *

*Efeito significativo ($p < 0,05$). NS: no significativo. GQ: glicosídeos de quercetina; GC: glicosídeos de caempferol; ACu: ácido *p*-cumárico; AF: ácido ferúlico; AH: ácidos hidroxicinâmicos.

O aumento da temperatura de cozimento de 100 para 121 °C não influenciou significativamente os teores de ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico. Não obstante, um aumento da temperatura de cocção de 100 para 121 °C implicou em uma redução de 4,94 mg/100 g b.s no valor da média geral dos glicosídeos de caempferol, independentemente dos níveis dos outros fatores.

Apesar do perfil de flavonóides e ácidos fenólicos serem diferentes na cultivar Jalo Precoce, a retenção de compostos fenólicos foi maior nos tratamentos sem maceração prévia e sem drenagem após o cozimento (Tabela 15), como também foi observado na cultivar preta FT Nobre.

Com base nos teores de flavonóides e ácidos fenólicos quantificados para o feijão cru das cultivares FT Nobre e Jalo Precoce (Tabelas 13 e 15, respectivamente), é possível calcular a porcentagem de perda ou aumento de cada composto fenólico produzida por efeito dos diferentes tratamentos. A variação dos teores de flavonóides e ácidos fenólicos com relação aos conteúdos iniciais no feijão cru da cultivar preta FT Nobre é apresentada nas Figuras 21 e 22, respectivamente. Perdas significantes nos teores de antocianinas totais (>70%) foram observadas em todos os tratamentos; no entanto, a redução foi menor (54%) no tratamento sem maceração, sem drenagem e cozido a 100 °C. Os glicosídeos de caempferol e quercetina diminuíram significativamente (>70%) nos tratamentos com maceração e drenagem após o cozimento, independentemente da temperatura de cocção. Porém, os teores de flavonóis aumentaram cerca de 25% com relação aos teores iniciais do feijão preto cru, nos tratamentos sem maceração e sem drenagem posterior, isto é, sem eliminação da água de cocção.

Similarmente ao observado para as antocianinas, os teores de ácidos hidroxicinâmicos (Figura 22) diminuíram em todos os tratamentos após o cozimento, sendo que as perdas foram menores nos tratamentos sem maceração e sem drenagem posterior. O cozimento do feijão preto cultivar FT Nobre macerado em água previamente e com drenagem posterior ao processo térmico, implicou em uma perda significativa (cerca de 80%) do ácido ferúlico. Porém, os teores desse ácido fenólico aumentaram significativamente nos tratamentos sem

maceração e sem drenagem, sendo que o aumento foi maior quando o feijão foi cozido a 121 °C que a 100 °C (aumento de 80 e 30%, respectivamente).

Figura 21. Porcentagem de perda ou aumento do teor de flavonóides do feijão inteiro preto cultivar FT Nobre depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).

Figura 22. Porcentagem de perda ou aumento do teor de ácidos fenólicos do feijão inteiro preto cultivar FT Nobre depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).

A variabilidade nos teores de flavonóides e ácidos fenólicos em relação aos conteúdos iniciais do feijão cru da cultivar Jalo Precoce apresentou uma tendência similar à observada na cultivar preta após o tratamento térmico (Figuras 23 e 24). A aplicação de um macerado prévio e drenagem posterior ao cozimento produziram as maiores perdas de flavonóides (cerca de 60%) e como no caso da cultivar preta, os glicosídeos de caempferol e quercetina aumentaram depois do processo térmico nos tratamentos sem maceração e sem drenagem. Independentemente da temperatura de cocção, e considerando os altos teores de

glicosídeos de caempferol no feijão cru inteiro ($30,7 \pm 0,2$ mg/100 g b.s.), o aumento desse flavonóide (cerca de 60%) indica o potencial dessa cultivar como fonte interessante de glicosídeos de caempferol após o cozimento ($48,8 \pm 0,1$ e $47,1 \pm 0,4$ mg/100 g b.s. para os tratamentos sem maceração e sem drenagem a 100 e 121 °C, respectivamente).

Figura 23. Porcentagem de perda ou aumento do teor de flavonóides do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).

Figura 24. Porcentagem de perda ou aumento do teor de ácidos fenólicos do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial do feijão cru, em base seca).

Quanto aos ácidos fenólicos, as maiores perdas de ácidos hidroxicinâmicos foram observadas nos tratamentos com maceração e drenagem. Os teores de ácidos fenólicos livres como o ácido *p*-cumárico e ferúlico foram reduzidos em todos os tratamentos com exceção daqueles onde o feijão não foi macerado e não foi drenado após o cozimento; assim, observou-se um aumento significativo no teor de ácido ferúlico (60%), independentemente da temperatura de cozimento. Não obstante, o ácido ferúlico não foi detectado por HPLC nos tratamentos com maceração e drenagem, o que indica a elevada solubilidade desse ácido fenólico na água de maceração e de cozimento.

Segundo o exposto anteriormente para ambas as cultivares de feijão, a diminuição dos teores de ácidos hidroxicinâmicos nos tratamentos com maceração prévia e drenagem posterior ao cozimento indica uma perda evidente desses compostos por lixiviação ou difusão na água de maceração e cocção. Além disso, observou-se que o aumento de certos ácidos fenólicos livres como o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico (cultivar Jalo Precoce) nos tratamentos sem maceração e sem drenagem foi associado com uma moderada diminuição nos teores de ácidos hidroxicinâmicos conjugados nessas mesmas condições de cozimento. O anterior poderia indicar que o tratamento térmico produziu algum tipo de hidrólise dos ácidos hidroxicinâmicos conjugados resultando na liberação de ácidos fenólicos livres. A esse respeito, RAKIC *et al.* (2007), observaram que após o tratamento térmico de nozes procedentes da Serbia, o conteúdo de ácidos fenólicos simples como o ácido gálico livre aumentaram significativamente, enquanto os teores de taninos diminuíram, indicando que o processo térmico promoveu a hidrólise dos taninos hidrolisáveis conduzindo a um aumento de fenólicos mais simples como o ácido gálico. Similarmente, CLIFFORD (2000) relatou que os ácidos cinâmicos como o ácido caféico, ferúlico e *p*-cumárico raramente estão na forma livre nos alimentos, geralmente estão conjugados, e somente são liberados ou desconjugados após um processo de hidrólise produzido por exemplo durante o tratamento térmico do alimento. Os ácidos cinâmicos liberados podem ser posteriormente descarboxilados e degradados a vários tipos de fenólicos simples quando o tratamento térmico é mais drástico (CLIFFORD, 2000).

Além disso, o aumento significativo de ácido ferúlico nos tratamentos sem maceração e sem drenagem, apesar da aplicação de temperaturas de 121 °C, pode também estar relacionado com a melhor estabilidade térmica desse ácido fenólico. MORELLO *et al.* (2004) indicaram que os ácidos fenólicos em geral apresentam melhor estabilidade frente ao calor que outros compostos fenólicos.

Como explicado para o caso dos ácidos hidroxicinâmicos, os teores de flavonóis também foram reduzidos significativamente, tanto por efeito do macerado quanto por efeito do drenado, após o tratamento térmico em ambas as cultivares de feijão em estudo. Porém, um aumento moderado dos conteúdos desses compostos foi observado nos tratamentos onde não houve perdas por solubilização ou difusão desses compostos na água (sem maceração e sem drenagem). DIAZ-BATALLA *et al.* (2006) relataram que os níveis de quercetina e caempferol em diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) mexicanos foram reduzidos em 12-65% e 5-71%, respectivamente, quando os feijões foram autoclavados sem maceração prévia e liofilizados juntamente com a água de cozimento. Ao contrário, PRICE *et al.* (1998) não observaram variações significantes nos teores de glicosídeos de quercetina e caempferol antes e depois do tratamento térmico do feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.) e, adicionalmente, indicaram que os flavonóis glicosilados não foram hidrolisados por efeito do calor. Por outro lado, BUNEA *et al.* (2008) indicaram que o tratamento térmico pode conduzir a uma ruptura da matriz alimentar resultando em uma melhor liberação de compostos fenólicos ligados a macromoléculas. Isto poderia explicar o aumento de flavonóis nos tratamentos sem maceração e sem drenagem no presente trabalho; no entanto, a estabilidade térmica dos flavonóis poderia também estar envolvida. LOMBARD *et al.* (2005) relataram a estabilidade térmica de diferentes glicosídeos de quercetina detectados na cebola antes e depois de vários tipos de tratamento térmico.

4.2.3.3 Efeito sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante

Na Tabela 17 são apresentados os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante do feijão preto cultivar FT Nobre obtidos após os diferentes tipos de tratamento térmico. A Tabela 18 mostra os valores dos efeitos de cada fator e interação sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante, além do grau de significância estatística de cada efeito ($p < 0,05$).

Em geral, todos os fatores e suas interações influenciaram significativamente e inversamente no processo; porém, da mesma forma que foi observado para os flavonóides e ácidos fenólicos, os fatores com maior influência sobre os teores de ácidos fenólicos e a capacidade antioxidante do feijão preto, após o tratamento térmico, foram a “maceração” e a “drenagem”. A aplicação da drenagem posterior ao tratamento térmico reduziu a média geral de fenólicos totais em 1,74 mg equivalentes de catequina/g (b.s.), similarmente o tratamento térmico com maceração prévia do feijão determinou uma diminuição da média geral em 1,09 mg equivalentes de catequina/g (b.s.), independentemente dos níveis dos outros fatores.

De acordo com a análise de variância e a comparação de médias (Tabela 17), os maiores valores de fenólicos totais e capacidade antioxidante foram obtidos nos tratamentos sem maceração e sem drenagem do líquido de cozimento. Entre os tratamentos sem maceração, não houve diferença significativa entre a capacidade antioxidante obtida para os tratamentos sem drenagem e cozido a 100 °C e sem drenagem e cozido a 121 °C. O mesmo foi observado para os tratamentos sem maceração e com drenagem posterior ao cozimento. Independentemente do líquido de cocção ter sido eliminado ou não, os resultados indicam que o cozimento do feijão (sem maceração prévia) a 100 ou 121 °C, não implicou maior variabilidade na capacidade do seqüestro de radicais livres do feijão preto.

Tabela 17. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante do feijão preto inteiro cultivar FT Nobre cru e cozido sob diferentes condições^a.

		SEM MACERAÇÃO				COM MACERAÇÃO			
		100 °C		121 °C		100 °C		121 °C	
		Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar
FT ^b	2,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1 e	3,1 ± 0,1 b	1,5 ± 0,1 f	3,7 ± 0,1 a	0,51 ± 0,03 g	2,02 ± 0,15 d	0,65 ± 0,02 g	2,46 ± 0,12 c
CA ^c	5,8 ± 0,4	3,6 ± 0,6 c	7,2 ± 0,3 a	3,7 ± 0,2 c	7,3 ± 0,4 a	1,9 ± 0,1 d	4,2 ± 0,4 c	2,3 ± 0,1 d	4,9 ± 0,4 b

^a Valores são médias ± DP. ^b mg equivalentes de catequina/g amostra em base seca. ^c µmoles equivalentes de Trolox/g amostra em base seca. FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 18. Valores dos efeitos calculados sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar FT Nobre após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2^3 (3 fatores com 2 níveis).

Fator ou interação	FT		CA	
Maceração (com e sem)	- 1,09 ± 0,03	*	- 2,11 ± 0,1	*
Temperatura (100 e 121 °C)	0,21 ± 0,03	*	0,32 ± 0,1	*
Drenagem (com e sem)	- 1,74 ± 0,03	*	- 3,02 ± 0,1	*
Maceração x Temperatura	0,06 ± 0,03	*	0,20 ± 0,1	*
Maceração x Drenagem	0,08 ± 0,03	*	0,55 ± 0,1	*
Temperatura x Drenagem	- 0,26 ± 0,03	*	- 0,14 ± 0,1	NS
Maceração x Temperatura x Drenagem	0,12 ± 0,03	*	- 0,09 ± 0,1	NS

*Efeito significativo ($p < 0,05$), NS: não significativo. FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante.

Os valores dos teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante da cultivar Jalo Precoce após os diferentes tratamentos são apresentados na Tabela 19, e os valores dos efeitos dos diferentes tratamentos sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante dessa cultivar são mostrados na Tabela 20.

Embora os efeitos dos fatores principais e as interações respectivas tenham mostrado uma tendência similar ao mencionado para a cultivar preta, o efeito da drenagem sobre a capacidade antioxidante do feijão Jalo Precoce, independentemente dos níveis dos outros fatores, foi maior que o efeito do fator “maceração”. Assim, o cozimento do feijão com uma drenagem posterior reduziu o valor da média geral em 6,53 μ moles equivalentes de Trolox/g (b.s.). Isso indica que as perdas na capacidade antioxidante dessa cultivar foram mais significantes quando o feijão foi drenado após o cozimento, independentemente da temperatura de cocção e do feijão ter sido macerado previamente ou não.

Tabela 19. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce cru e cozido sob diferentes condições^a.

		SEM MOLHO				COM MOLHO			
		100 °C		121 °C		100 °C		121 °C	
Feijão cru		Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar	Drenado	Sem drenar
FT ^b	2,4 ± 0,1	1,93±0,05 d	3,59±0,04 a	1,48±0,02 e	3,67±0,04 a	0,77 ± 0,04f	2,3 ± 0,1 c	0,71 ± 0,05f	2,67±0,05b
CA ^c	6,4 ± 0,6	5,7 ± 0,2 d	11,5 ± 0,3 a	4,1 ± 0,3 e	11,9 ± 0,5 a	2,6 ± 0,1 f	8,1 ± 0,6 c	2,5 ± 0,2 f	9,4 ± 0,6 b

^a Valores são médias ± DP. ^b mg equivalentes de catequina/g amostra em base seca. ^c µmoles equivalentes de Trolox/g amostra em base seca. FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 20. Valores dos efeitos calculados sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce após o tratamento térmico quando aplicado um esquema fatorial 2^3 (3 fatores com 2 níveis).

Fator ou interação	FT		CA	
Maceração (com e sem)	- 1,05 ± 0,02	*	- 2,61 ± 0,11	*
Temperatura (100 e 121 °C)	- 0,01 ± 0,02	NS	- 0,02 ± 0,11	NS
Drenagem (com e sem)	-1,84 ± 0,02	*	- 6,53 ± 0,11	*
Maceração x Temperatura	0,17 ± 0,02	*	0,58 ± 0,11	*
Maceração x Drenagem	0,09 ± 0,02	*	0,32 ± 0,11	*
Temperatura x Drenagem	- 0,24 ± 0,02	*	- 0,81 ± 0,11	*
Maceração x Temperatura x Drenagem	0,02 ± 0,02	NS	0,18 ± 0,11	NS

*Efeito significativo ($p < 0,05$). NS: não significativo. FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante.

O único fator que não apresentou um efeito estatisticamente significativo sobre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante foi a temperatura, o que indica que um aumento da temperatura de cozimento de 100 para 121 °C não implicou em maior variabilidade nos teores de fenólicos totais e na capacidade do seqüestro de radicais livres do feijão Jalo Precoce, independentemente do feijão ter sido macerado ou se foi drenado ou não após o tratamento térmico.

Como mencionado no item 4.2.1, o conteúdo de taninos condensados nas cultivares de feijão avaliadas (sem processo térmico) foi significativo, e concentrou-se na fração da casca da semente. Porém, após os diferentes tratamentos térmicos, não foram detectados taninos condensados em nenhuma das cultivares avaliadas sob as condições experimentais do presente trabalho. GRANITO *et al.* (2007) relataram uma perda significativa (cerca de 84%) no teor de taninos condensados em *Phaseolus lunatus* após o cozimento a 100 °C, sendo que as perdas aumentaram com a aplicação de processos térmicos mais severos, concluindo que as perdas relacionaram-se significativamente mais com a temperatura de processamento do que com as perdas por lixiviação dos taninos na água do macerado ou de cozimento. Similarmente, APARÍCIO-FERNANDEZ *et*

al. (2005) reportaram perdas de 70% nos teores de taninos condensados quando o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi cozido a 100 °C por 2 hs 30 min.

Durante o processo térmico das leguminosas, os taninos condensados diminuem dependendo das condições de tempo e temperatura aplicados indicando perdas possíveis por lixiviação na água de cozimento. No entanto, os taninos também são susceptíveis ao calor e à formação de complexos insolúveis com as proteínas, sendo que esses complexos não são quantificados pelos métodos tradicionais de análise como o método da vanilina (BUTLER *et al.*, 1980; BRESSANI *et al.*, 1982; GRANITO *et al.*, 2007). A esse respeito, GUZMAN-MALDONADO *et al.* (1996) indicam que, com a finalidade de obter o conteúdo real de taninos condensados no feijão, a determinação deve ser realizada na casca do feijão, fração onde os taninos condensados encontram-se concentrados. No presente trabalho, a análise de taninos condensados foi realizada no feijão inteiro com a finalidade de ter resultados comparáveis com as outras variáveis analisadas, porém a interferência das proteínas do cotilédone na quantificação dos taninos condensáveis poderia explicar os resultados obtidos.

Com base nos dados obtidos para os feijões FT Nobre e Jalo Precoce antes de processo térmico (Tabelas 17 e 19, respectivamente), foram calculadas as porcentagens de perda ou aumento dos teores de fenólicos totais e da capacidade antioxidante após os diferentes tratamentos aplicados (Figuras 25 e 26 para as cultivares FT Nobre e Jalo Precoce, respectivamente).

Perdas significantes foram observadas nos teores de fenólicos totais e na capacidade antioxidante do feijão preto FT Nobre (70-77 e 60-67%, respectivamente) nos tratamentos com maceração e drenado, independentemente da temperatura de cocção. Similarmente, para a cultivar Jalo Precoce, as perdas nos tratamentos com maceração e drenagem foram de 68-70% e 59-61% para os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante, respectivamente. Menores perdas foram observadas para os tratamentos sem maceração e drenado após o cozimento em ambas as cultivares de feijão.

Figura 25. Porcentagem de perda ou aumento do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante do feijão inteiro preto cultivar FT Nobre depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial no feijão cru, em base seca).

Figura 26. Porcentagem de perda ou aumento do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante do feijão inteiro cultivar Jalo Precoce depois do tratamento térmico, sob diferentes condições (calculado com relação ao conteúdo inicial no feijão cru, em base seca).

Os tratamentos sem maceração e sem drenagem do líquido de cocção depois do tratamento térmico mostraram uma tendência diferente ao resto dos tratamentos para ambas as cultivares de feijão. Tanto os teores de fenólicos totais quanto a capacidade antioxidante aumentaram em relação aos valores obtidos para o feijão cru. Os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante aumentaram em 41-68% e 24-26%, respectivamente no feijão preto FT Nobre.

Entretanto, na cultivar Jalo Precoce, observou-se um aumento maior na capacidade antioxidante (80-86%) que nos teores de fenólicos totais (50-53%). Convém ressaltar que o aumento nos teores de fenólicos totais e na capacidade antioxidante nesses tratamentos parece estar também, associado ao aumento observado nos teores dos glicosídeos de quercetina, caempferol e alguns ácidos fenólicos como o ácido ferúlico, como mencionado anteriormente para as cultivares avaliadas.

Em geral, o processamento térmico diminui o conteúdo total de compostos fenólicos nas leguminosas. GRANITO *et al.* (2007) observaram que temperaturas elevadas características de tratamentos térmicos mais severos como nos processos de secagem, poderiam afetar os anéis aromáticos dos compostos fenólicos, fazendo-os mais sensíveis a reações de polimerização e/ou levando à decomposição dos anéis aromáticos. Não obstante, os compostos fenólicos em muitos alimentos estão covalentemente unidos a grupos funcionais aminados ou se encontram na forma de compostos glicosilados (SHAHIDI & NACZK, 1995). Dessa forma, tem sido demonstrado que o tratamento térmico pode hidrolisar essas estruturas conduzindo a um aumento significativo, ou não influenciando o conteúdo de fenólicos totais em algumas leguminosas (THUDNATKORN & LIU, 2004). ROCHA-GUZMAN *et al.* (2007) reportaram um aumento na capacidade antioxidante avaliada pelo método do DPPH• no feijão cozido a 121 °C sem maceração e drenado, independentemente da cultivar avaliada. Similarmente, KHATUN *et al.* (2006) relataram que após o tratamento térmico, tanto os teores de fenólicos totais quanto a capacidade antioxidante determinada pelo método do DPPH• aumentaram nas diferentes especiarias avaliadas no seu estudo. Além disso, SEOK-MOON *et al.* (2004) ressaltaram que alguns processos podem liberar os compostos fenólicos covalentemente unidos levando a um aumento na capacidade antioxidante do alimento. Assim, tem sido reportado que o tratamento térmico parece liberar alguns compostos de baixo peso molecular e dessa forma aumentar a capacidade antioxidante da casca de frutas cítricas (SEUNG-CHEOL *et al.*, 2005).

Na presente pesquisa, é possível que o tratamento térmico tenha produzido a liberação de alguns compostos fenólicos como os flavonóis ou ácidos fenólicos, o qual parece estar relacionado com o aumento na capacidade antioxidante do feijão cozido nos tratamentos sem maceração prévia e sem drenagem do líquido de cozimento. Porém, o aumento na capacidade antioxidante do feijão pode ser devido à influência de outros compostos não fenólicos melhor solubilizados após o tratamento térmico (DEWANTO *et al.*, 2002) ou compostos formados como consequência da aplicação de elevadas temperaturas como os produtos das reações de Maillard, os quais tem também mostrado potencial como seqüestradores de radicais livres (NICOLI *et al.*, 1997b).

4.3 CONCLUSÕES

4.3.1 Feijão

- As cascas de feijão exibiram maiores concentrações de compostos fenólicos que os cotilédones. Dessa maneira, fenólicos como taninos condensados, antocianinas, e outros flavonóides tais como glicosídeos de quercetina e caempferol concentram-se principalmente na casca, enquanto que os cotilédones são ricos em derivados do ácido hidroxicinâmico.
- Qualitativamente, a cor da semente parece estar relacionada com um perfil característico de compostos fenólicos. Do ponto de vista quantitativo, o tipo de cultivar teve uma influência significativa sobre a variabilidade observada nos teores dos compostos fenólicos.
- Os resultados do presente trabalho sugerem que os taninos condensados são os compostos fenólicos fortemente relacionados com a capacidade antioxidante da casca de feijão. Nos grupos de casca preta e vermelha, as antocianinas são os flavonóides que contribuem significativamente com sua capacidade antioxidante.

4.3.2 Lupino

- A espécie teve uma influência significativa nos perfis de isoflavonas do lupino.
- Foram detectadas isoflavonas (genisteína e um possível derivado da genisteína) só nas cultivares de *L. mutabilis* Sweet, concentrando-se sobretudo na fração cotilédone da semente.
- As isoflavonas parecem ser os principais fenólicos que contribuem significativamente com a capacidade antioxidante da casca, cotilédone e hypocótilo de *L. mutabilis* Sweet.
- A cultivar H-6 (*L. mutabilis* Sweet) destacou-se por seus altos teores de isoflavonas totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante.

4.3.3 Efeito do tratamento térmico sobre os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante das cultivares selecionadas de feijão

- Os teores de compostos fenólicos como os flavonóis, ácidos fenólicos, e fenólicos totais, e a capacidade antioxidante dos feijões das cultivares FT Nobre e Jalo Precoce, variaram dependendo do tipo de tratamento térmico aplicado.
- Os fatores com maior influência na perda de compostos fenólicos e na redução da capacidade antioxidante dos feijões após o tratamento térmico foram a aplicação e eliminação da água de maceração antes do tratamento térmico e a drenagem do líquido de cozimento após o cozimento.
- Os resultados sugerem que o cozimento do feijão sem maceração prévia e sem drenagem do líquido de cocção, permite um aumento nos teores de flavonóis e ácidos fenólicos, o qual parece estar correlacionado com o aumento nos teores de fenólicos totais e na capacidade antioxidante do feijão.
- Recomenda-se que o cozimento do feijão, tanto a 100 °C ou a 121 °C, seja realizado sem maceração ou sem eliminar a água de maceração, e sem drenagem do líquido de cozimento, com a finalidade de reter ao máximo os compostos fenólicos antioxidantes.

5. FUNCIONALIDADE DE GRÃOS TRADICIONAIS SELECIONADOS QUANTO A SEU POTENCIAL ANTI-HIPERGLICÊMICO E ANTI-HIPERTENSIVO

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A diabetes tipo 2 é uma desordem metabólica caracterizada por um aumento anormal de glicose no sangue ou hiperglicemia, que subseqüentemente, conduz a defeitos na secreção da insulina e/ou na ação da insulina, sendo que sua manifestação ao longo prazo pode resultar no desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares (MATSUI *et al.*, 2006). O tratamento das etapas iniciais da diabetes tipo 2 através do uso de inibidores do metabolismo de carboidratos, como os inibidores da α -amilase pancreática e das α -glicosidases intestinais, poderia reduzir significativamente o aumento pós-prandial da glicose (GODBOUT & CHIASSON, 2007). Devido aos efeitos colaterais dos inibidores sintéticos atualmente utilizados, o consumo de inibidores naturalmente presentes na dieta poderia constituir uma terapia efetiva para o tratamento da hiperglicemia e com mínimas reações adversas (MATSUI *et al.*, 2006).

Paralelamente a hipertensão, uma das complicações a longo prazo da diabetes tipo 2, pode ser controlada mediante a modulação da enzima conversora da angiotensina (ACE), enzima chave associada à manutenção da tensão vascular e conseqüentemente, envolvida no aumento ou diminuição da pressão arterial. O controle da hipertensão através da dieta poderia constituir também uma importante estratégia para o tratamento dessa doença (DZAU, 2001; CROOK & PENUMALEE, 2004).

Na etapa seguinte do trabalho, avaliaram-se algumas cultivares selecionadas de feijão, além de outros grãos procedentes da região dos Andes, com relação a seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo utilizando diversos ensaios enzimáticos *in vitro*. Devido à possível interferência do solvente (metanol), utilizado inicialmente para a caracterização dos compostos fenólicos dos feijões, sobre a atividade das enzimas a serem utilizadas nos ensaios seguintes, procedeu-se a

realização de análises utilizando extratos aquosos dos grãos, no lugar de usar extratos metanólicos.

Além disso, foram também determinados os teores de fenólicos totais, perfil de compostos fenólicos por CLAE e a capacidade antioxidante dos extratos aquosos, com a finalidade de avaliar se o efeito biológico associado ao potencial anti-hiperglicêmico ou anti-hipertensivo dos grãos em estudo apresenta correlação com certos compostos fenólicos ou com os teores de compostos fenólicos em geral.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

5.2.1.1 Feijões

Foram avaliadas 10 cultivares de feijão, 4 cultivares brasileiras previamente selecionadas a partir da primeira etapa do trabalho, por apresentarem os maiores teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, e 6 cultivares de feijão de origem peruana, fornecidas pelo Programa de Leguminosas da Universidade Nacional Agrária La Molina (Lima-Peru) e cultivadas em diferentes altitudes (litoral ou Andes) (Tabela 21).

Tabela 21. Características dos feijões avaliados com relação ao seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo.

Código	Cultivar	Cor da casca	Origem
A	Canário Centenário	Amarela	Litoral-Peru
B	Canário Centenário	Amarela	Andes-Peru
C	Canário CIFAC 92017	Amarela	Litoral-Peru
D	Canário CIFAC 92017	Amarela	Andes-Peru
E	Blanco Molinero	Branca	Litoral-Peru
F	Blanco Molinero	Branca	Andes-Peru
G	FT Nobre	Preta	Brasil
H	BRS Timbó	Vermelha	Brasil
I	BRS Tropical (8202)	marrom com listras marrons	Brasil
J	Jalo Precoce	marrom amarelada	Brasil

5.2.1.2 Grãos andinos

Os grãos tradicionais representativos da região dos Andes do Peru, incluíram pseudo-cereais, cereais e leguminosas e são apresentados na Tabela 22. Os pseudo-cereais e cereais foram obtidos em mercado local, da região de Arequipa (Andes-Peru). As sementes de *Lupinus mutabilis* Sweet H-6 e SLP-1, selecionadas previamente na primeira fase do trabalho por apresentarem maiores teores de isoflavonas e capacidade antioxidante, foram fornecidas pelo Programa de Leguminosas da Universidade Nacional Agrária La Molina (Lima-Peru).

Tabela 22. Pseudo-cereais, cereais e leguminosas avaliadas quanto ao seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo.

Código	Nome comum	Nome científico	Tipo
1	Kañiwa	<i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen	P
2	Quinoa vermelha	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	P
3	Kiwicha	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	P
4	Milho 1 (roxo)	<i>Zea mays</i> L.	C
5	Milho 2 (amarelo, listras roxas-vermelhas)	<i>Zea mays</i> L.	C
6	Milho 3 (amarelo, listras vermelhas)	<i>Zea mays</i> L.	C
7	Milho 4 (semente metade amarela-metade vermelha)	<i>Zea mays</i> L.	C
8	Milho 5 (listras roxas)	<i>Zea mays</i> L.	C
9	Tarwi SLP-1	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	L
10	Tarwi H-6	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	L

P: pseudo-cereal; C: cereal; L: leguminosa.

5.2.2 Enzimas e reagentes

Foram utilizadas α -amilase pancreática porcina (EC 3.2.1.1), a α -glicosidase derivada da levedura para panificação (EC 3.2.1.20) e enzima

conversora da angiotensina de pulmão de coelho (EC 3.4.15.1) da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), assim como os padrões de quercetina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido *p*-cumárico e ácido protocatecuico. Todos reagentes utilizados foram de grau analítico, ou grau cromatográfico quando necessário.

5.2.3 Métodos

5.2.3.1 Preparo do extrato do feijão

As sementes de feijão (10 g) foram maceradas em 10 mL de água destilada por 16 hs a 25 °C. Os feijões foram cozidos em autoclave a 121 °C por 10 min. Foram adicionados 40 mL de água destilada aos feijões cozidos e a mistura foi homogeneizada por 1 min utilizando um homogenizador de laboratório (Waring Laboratory, Torrington, CT), calibrado em velocidade “máxima”. Os homogenatos foram centrifugados a 9300 *g* por 30 min. Uma alíquota do sobrenadante foi centrifugada novamente a 3000 rpm por 10 min antes de cada ensaio *in vitro*. Os feijões crus foram preparados similarmente. As extrações foram realizadas em duplicada.

5.2.3.2 Preparo do extrato dos grãos andinos

Os grãos (10 g) foram maceradas em 15 mL de água destilada por 16 hs a 25 °C com a finalidade de facilitar o processo térmico seguinte. Os pseudo-cereais e as leguminosas foram autoclavadas a 121 °C por 10 min, enquanto que as amostras de milho precisaram de um maior tempo de cozimento (20 min). A seguir, adicionou-se 85 mL de água destilada, e a mistura foi homogeneizada por 1 min utilizando um homogenizador de laboratório (Waring Laboratory, Torrington, CT), calibrado em velocidade “máxima”. Os homogenatos foram centrifugados a 9300 *g* por 30 min, e o pH dos sobrenadantes foi corrigido até uma faixa de 6-8. Uma alíquota do sobrenadante foi centrifugada novamente a 3000 rpm por 10 min antes de cada ensaio *in vitro*. As extrações foram realizadas em duplicada.

5.2.3.3 Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais nos extratos aquosos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu modificado por SHETTY *et al.* (1995). 1 mL do extrato foi transferido para um tubo de ensaio e misturado com 1 mL de etanol 95% e 5 mL de água destilada. A seguir, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 50% (v/v) foi adicionado e a mistura foi agitada. Após 5 min, adicionou-se 1 mL de solução 5% de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em lugar escuro por 60 min. As absorbâncias foram determinadas a 725 nm. A curva padrão foi realizada utilizando várias concentrações de ácido gálico em etanol 95%, e os resultados foram expressos como mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra em base úmida (b.u.).

5.2.3.4 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de seqüestro de radicais livres do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), de acordo ao método modificado por KWON *et al.* (2006). Uma alíquota de 250 µL de extrato aquoso foi colocado em eppendorfs de 2 mL e procedeu-se à adição de 1.25 mL de uma solução 60 µM de DPPH• em etanol 95%. A diminuição da absorbância foi monitorada depois de 1 min de reação a 517 nm. Um controle (água destilada no lugar do extrato) foi também incluído na análise. A porcentagem de inibição do radical livre DPPH• foi calculada de acordo como a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{517} (\text{controle}) - A_{517} (\text{extrato})}{A_{517} (\text{controle})} \times 100$$

Onde:

A_{517} = Absorbância a 517 nm

5.2.3.5 Atividade inibitória da α -amilase

A atividade inibitória da α -amilase foi determinada de acordo com o WORTHINGTON ENZYME MANUAL (1993), com algumas modificações. Em cada

tubo de ensaio, uma alíquota de 500 µL de cada extrato foi adicionada a 500 µL de uma solução enzimática de α -amilase (0,5 mg/mL) em buffer fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9 com 0,006 M NaCl) e os tubos foram deixados em incubação a 25 °C por 10 min. Após o período de pré-incubação, foram adicionados 500 µL de uma solução de amido 1% preparada em buffer fosfato 0,02 M (pH 6,9 com 0,006 M NaCl) a cada tubo de ensaio. Os tubos foram incubados novamente a 25 °C por 10 min. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 1 mL do reagente ácido dinitrosalicílico. Os tubos foram incubados em banho de água a 100 °C por 5 min e esfriados a temperatura ambiente. Foram adicionados 15 mL de água destilada a cada tubo e a absorbância foi determinada a 540 nm. Um branco por amostra (buffer no lugar da solução enzimática) e um controle (buffer no lugar do extrato da amostra) foram também incluídos na análise. A atividade inibitória da α -amilase foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{540} (\text{controle}) - A_{540} (\text{extrato})}{A_{540} (\text{controle})} \times 100$$

Onde:

A_{540} = Absorbância a 540 nm

5.2.3.6 Atividade inibitória da α -glicosidase

A atividade inibitória da α -glicosidase foi determinada de acordo com o WORTHINGTON ENZYME MANUAL (1993) modificado por McCUE *et al.* (2005). As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA). Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 50 µL do extrato da amostra e 50 µL de buffer fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,9). A seguir, foram adicionados 100 µL de uma solução enzimática de α -glicosidase (1.0 U/mL) em buffer fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,9). Após 10 min a 25 °C, 50 µL de *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranoside 5 mM em buffer fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,9) foram adicionados a cada cavidade. Procedeu-se a incubação da mistura de reação a 25 °C por 5 min. As leituras de absorbância a 405 nm foram

registradas por um espectrofotômetro de microplaca (Thermomax; Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA) realizadas antes e depois do período de incubação. As leituras foram comparadas com um controle (50 µL de buffer no lugar do extrato). A atividade inibitória da α -glicosidase foi expressa como porcentagem de inibição de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\Delta A_{405} (\text{controle}) - \Delta A_{405} (\text{extrato})}{\Delta A_{405} (\text{controle})} \times 100$$

Onde:

Δ = (Leitura 5 min – Leitura 0 min)

A₄₀₅ = (Absorbância a 405 nm)

5.2.3.7 Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ACE-I)

A inibição da enzima conversora da angiotensina I foi realizada segundo o método modificado por KWON *et al.* (2006b). Em eppendorfs de 2 mL foram incubados 50 µL de cada extrato com 200 µL de solução enzimática de ACE (2 mU) em buffer borato-NaCl 0,1 M (0,3 M de NaCl e pH 8,3). Após um período de pré-incubação a 25 °C por 10 min, 100 µL de substrato (hipuril-histidil-leucina ou angiotensina I) foram adicionados e os eppendorfs foram incubados a 37 °C por 1 hora. A reação enzimática foi interrompida mediante a adição de 150 µL de HCL 0,5 N. Um controle (água destilada no lugar da amostra), um branco por amostra (buffer no lugar da enzima e o substrato) e um branco da reação (água destilada no lugar da amostra e buffer no lugar da enzima) foram também incluídos na análise.

O ácido hipúrico formado durante a reação enzimática (produto) foi detectado e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Um volume de 5 µL de amostra foi injetada em um cromatógrafo da Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) série ALS 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba binária e detector de arranjo de diodo (DAD) série 1100, monitorado pelo software Chemstation. As fases móveis usadas foram: (A) ácido

fosfórico 10 mM (pH 2,5) e (B) metanol 100%. Para o gradiente de eluição, a concentração do solvente B aumentou até 60% durante os 8 primeiros min, chegando até 100% em 13 min e diminuiu até 0% após mais 5 min (tempo total de corrida 18 min). A coluna analítica utilizada foi da Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 x 4,6 mm d.i.) com material de empaque de 5 µm de tamanho de partícula e a um fluxo de 1 mL/min. Os eluatos foram monitorados a 228 nm e o ácido hipúrico foi utilizado como padrão para a identificação desse composto nas amostras, considerando as características do espectro e o tempo de retenção.

A porcentagem de inibição da ACE foi calculada considerando as áreas dos picos do ácido hipúrico identificados nas amostras, segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Área controle} - (\text{Área amostra} - \text{Área branco amostra}))}{(\text{Área controle} - \text{Área branco})} \times 100$$

5.2.3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de compostos fenólicos nos extratos aquosos

Os extratos (2 mL) foram filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (politetrafluoroetileno) (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) com poro de 0,22 µm. Um volume de 5 µL da amostra foi injetada em cromatógrafo da Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) série ALS 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba binária e detector de arranjo de diodos (DAD) série 1100, monitorado pelo software Chemstation. As fases móveis usadas foram: (A) ácido fosfórico 10 mM (pH 2,5) e (B) metanol 100%. Para o gradiente de eluição, a concentração do solvente B aumentou até 60% durante os 8 primeiros min, chegando até 100% em 15 min, e diminuiu até 0% após mais 3 min, sendo mantida assim por 7 min (tempo total de corrida 25 min). A coluna analítica utilizada foi da Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 x 4,6 mm d.i.) com material de empaque de 5 µm de tamanho de partícula e a um fluxo de 1 mL/min. Os eluatos foram monitorados a 306, 333 e 525 nm, e as amostras foram injetadas por duplicata. A identificação dos picos foi realizada comparando-se os tempos de

retenção e os espectros obtidos com os dos padrões usados na calibração e os dados de espectros da biblioteca. A calibração dos padrões foi realizada através da injeção dos padrões em metanol 100% a diferentes concentrações. No caso dos glicosídeos de quercetina, os resultados foram expressos como mg de aglicona (quercetina), e os ácidos fenólicos como mg do padrão respectivo. Os resultados foram expressos por 100 g de amostra em base úmida (b.u.).

5.2.3.9 Análise estatística

Os resultados da CLAE (n=4) e das análises enzimáticas e espectrofotométricas (n=6) foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (1-way), a comparação de médias foi realizada pelo método de Tukey ($p < 0,05$) e as correlações de Pearson de acordo com o programa Statistica versão 5.0 (StatSoft, Tulsa, E.U.A.).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Funcionalidade do feijão quanto ao seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo e efeito do tratamento térmico

5.3.1.1 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante

A Figura 27 mostra o conteúdo de fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos extratos aquosos dos feijões antes e depois do tratamento térmico.

Observou-se uma correlação significativa entre os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante entre as cultivares de feijão cruas (Tabela 23). Os teores de fenólicos variaram entre $2,2 \pm 0,1$ mg e $5,9 \pm 0,3$ mg equivalentes de ácido gálico/g amostra base úmida (b.u.), enquanto a capacidade antioxidante calculada como porcentagem de inibição do radical DPPH• variou entre 33 e 85%. A cultivar vermelha BRS Timbó (amostra H) foi o feijão com o maior teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante; enquanto, as cultivares de casca mais clara, como a cultivar Blanco Molinero (amostra F) tiveram os mais baixos conteúdos de fenólicos totais. Em geral, os feijões com cascas mais escuras apresentaram os maiores conteúdos de fenólicos totais e capacidade antioxidante. Fato similar foi observado, quando as cascas foram avaliadas de forma separada na primeira parte do presente trabalho, embora as análises tenham sido realizadas em extratos metanólicos.

Figura 27. Conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante das cultivares de feijão antes e depois do processo térmico.

(A-E) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).

(a-e) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

Tabela 23. Coeficientes de correlação de Pearson para o feijão cru.

	CA ^a	GLIC ^a	AMI ^a	AC ^b	ACaf ^b	ACE ^b
FT ^a	0.93*	0.24*	-0.40*	-0.26	0.19	-0.42*
CA		0.36*	-0.36*	-0.30	0.13	-0.38*
GLIC			0.04	-0.02	-0.21	-0.08
AMI				0.004	0.01	0.13
CA					0.49*	0.12
Acaf						-0.20

* $p < 0,05$. ^a (n = 60). ^b (n = 40). FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante; GLIC: atividade inibitória da α -glicosidase (10 mg amostra); AMI: atividade inibitória da α -amilase (100 mg amostra); AC: teor de ácido clorogênico; ACaf: teor de ácido caféico; ACE = Atividade inibitória da ACE-I (10 mg amostra).

Entre as cultivares peruanas (amostras A até F), os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante variaram significativamente dependendo da altitude de cultivo do feijão. As cultivares Canário Centenário (A) e Blanco Molinero (E), cultivadas ao nível do mar (litoral), exibiram os maiores teores de fenólicos totais e a maior capacidade antioxidante que seus equivalentes cultivados a elevadas altitudes (B e F, respectivamente). Entretanto, as amostras C e D (Canário CIFAC 92017, cultivado a baixas e elevadas altitudes, respectivamente) mostraram tendências similares quanto a seus conteúdos de fenólicos totais. KORNER (1999) observou um aumento no conteúdo de compostos fenólicos e carotenóides em algumas plantas quando cultivadas a elevadas altitudes devido à maior radiação UV. A biossíntese de certos compostos fenólicos induzida por uma elevada exposição à radiação UV tem sido postulada e demonstrada em condições naturais (SPITALER *et al.*, 2006). No entanto, no presente trabalho, os resultados sugerem que os feijões cultivados a baixas altitudes apresentaram maiores conteúdos de fenólicos totais e capacidade antioxidante que os feijões cultivados a uma maior altitude. Portanto, outros fatores como o tipo de cultivar, condições de cultivo, e fatores genéticos podem também estar envolvidos.

Variações importantes foram observadas nos teores de fenólicos totais e na capacidade antioxidante após o tratamento térmico dos feijões cozidos em autoclave. Em geral, observou-se uma redução significativa dos fenólicos totais após o tratamento térmico em todas as cultivares avaliadas. As perdas de

fenólicos totais nos feijões peruanos (amostras A até F) variaram entre 30 e 40%, e foram menores que as apresentadas pelas cultivares brasileiras (50-70% de perdas). Quanto aos feijões cultivados a diferentes altitudes, as perdas de fenólicos foram similares entre as cultivares estudadas. BRIGIDE & CANNIATTI-BRAZACA (2006) observaram também perdas nos teores de fenólicos totais em *Phaseolus vulgaris* após o tratamento térmico. De acordo com XU & CHANG (2008), o mecanismo exato pelo qual, os fenólicos totais no feijão são reduzidos após tratamento térmico, não está completamente elucidado; porém, essa redução poderia ser explicada por possíveis transformações químicas como a decomposição de fenólicos, e a formação de complexos fenólico-proteína originados sob condições de alta pressão e temperatura. Adicionalmente, SIDDHURAJU & BECKER (2007) indicaram que o tratamento térmico pode induzir a formação de complexos tanino-carboidratos, incluindo complexos com os polissacarídeos da parede celular. Como consequência, os compostos fenólicos não são extraídos pelo solvente.

Apesar da redução dos teores de fenólicos totais após tratamento térmico, a capacidade antioxidante aumentou significativamente, sobretudo entre as cultivares peruanas; enquanto que a capacidade antioxidante não variou significativamente entre as cultivares brasileiras após o cozimento. Antes do tratamento térmico, a correlação entre os fenólicos totais e a capacidade antioxidante foi elevada ($r=0,93$); porém, após o cozimento, observou-se que o coeficiente de correlação foi menor ($r=0,60$) (Tabela 24). Isso poderia indicar que a capacidade antioxidante do feijão cozido parece depender não somente do conteúdo de fenólicos nos extratos aquosos, mas também de outros compostos com propriedades antioxidantes. De acordo com LOPEZ-HERNANDEZ *et al.* (1993), um dos maiores pigmentos também detectados no feijão são os carotenóides como a luteína e o β -caroteno. JIMENEZ-ESCRIG *et al.* (2000) têm relatado que esses compostos também apresentam capacidade de seqüestro de radicais livres como o DPPH•. O tratamento térmico tem mostrado a propriedade de aumentar a extração desses pigmentos (JARAMILLO-FLORES *et al.*, 2003) e, portanto, poderia ser uma das causas do aumento significativo da capacidade

antioxidante entre as cultivares de feijão amarelo do Peru. Além disso, um tratamento térmico intenso como a autoclavagem, pode conduzir à formação de compostos derivados da reação de Maillard, os quais também têm demonstrado propriedades antioxidantes significativas (NICOLI *et al.*, 1997a; NICOLI *et al.*, 1997b). Porém a influência de possíveis interações entre antioxidantes polifenólicos naturais dos feijões e antioxidantes gerados por efeito do processo térmico na capacidade antioxidante geral dos feijões cozidos também deveria ser considerada.

Table 24. Coeficientes de correlação de Pearson para o feijão cozido.

	CA ^a	GLIC ^a	AMI ^a	AC ^b	ACaf ^b	ACE ^b
FT ^a	0.60*	0.28*	0.45*	-0.56*	0.23	-0.70*
CA		0.26*	0.26*	-0.37*	-0.14	-0.78*
GLIC			0.25*	-0.45*	-0.07	-0.14
AMI				-0.43*	-0.11	-0.25
CA					0.50*	0.13
Acaf						-0.37*

* $p < 0,05$. ^a (n = 60). ^b (n = 40). FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante; GLIC: atividade inibitória da α -glicosidase (10 mg amostra); AMI: atividade inibitória da α -amilase (100 mg amostra); AC: teor de ácido clorogênico; ACaf: teor de ácido caféico; ACE = Atividade inibitória da ACE-I (10 mg amostra).

Em comparação com os dados apresentados para os extratos aquosos, outra tendência foi observada nos resultados obtidos na primeira parte do trabalho quanto à variabilidade dos teores de fenólicos totais após o tratamento térmico, quando foi realizada uma extração metanólica do feijão cozido. A diferença na solubilidade dos compostos fenólicos quando utilizados vários tipos de solventes poderia explicar tais divergências. CHEBIL *et al.* (2007) indicam que a solubilidade dos flavonóides está fortemente correlacionada com a natureza do solvente e a estrutura do flavonóide. A solubilidade desses compostos é muito baixa na água, se comparado com solventes orgânicos como o etanol, a acetonitrila e a acetona, ou suas soluções (ABOU EL HASSAN *et al.*, 2000; TOMMASINI *et al.*, 2004; CHEBIL *et al.*, 2007). Dessa maneira, os flavonóides e talvez outros compostos

fenólicos foram melhor solubilizados nos extratos metanólicos, resultando em aumento moderado no teor de fenólicos totais após o tratamento térmico, ao contrário do observado nos extratos aquosos.

5.3.1.2 Perfil de compostos fenólicos por CLAE

De acordo com as Figuras 28 e 29, foram identificados somente ácidos fenólicos como ácido clorogênico e ácido caféico nos extratos aquosos dos feijões crus e cozidos. O conteúdo de ácido clorogênico foi quase o dobro do ácido caféico, tanto nos feijões crus quanto nos feijões cozidos. A presença de ácido caféico juntamente com o ácido clorogênico é previsível já que esse último composto é um conjugado entre o ácido caféico e o ácido quínico (CLIFFORD, 2000). No entanto, na cultivar Jalo Precoce, foi detectado somente ácido caféico e não o ácido clorogênico.

Figura 28. Conteúdo de ácido clorogênico nas cultivares de feijão antes e depois do processo térmico.

(A-B) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).

(a-d) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

Figura 29. Conteúdo de ácido caféico nas cultivares de feijão antes e depois do processo térmico.

(A-B) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).

(a-d) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

Nos feijões crus, o conteúdo de ácido clorogênico variaram entre $14,9 \pm 0,2$ e $20,8 \pm 1,4$ mg/100 g (b.u.), enquanto que o ácido caféico variou entre $5,5 \pm 0,05$ e $10,6 \pm 0,7$ mg/100 g (b.u.) Em geral, os teores de ácido clorogênico foram similares em todas as cultivares com exceção da cultivar Canário Centenário (amostra B), a qual apresentou os mais baixos teores (14,9 mg/100 g b.u.). Entre as cultivares peruanas, os teores de ácido clorogênico e ácido caféico na cultivar Canário Centenário, cultivado em baixas altitudes (amostra A), foram significativamente maiores que seus equivalentes cultivados a maiores altitudes ($p < 0,05$). Porém, a altitude de cultivo não teve influência sobre os conteúdos dos ácidos fenólicos nas outras cultivares peruanas. Outros ácidos fenólicos como ácido ferúlico, *p*-cumárico e derivados do ácido benzóico como o ácido *p*-hidroxibenzóico, vanílico e siríngico também tem sido detectados no feijão (LUTHRIA & PASTOR-CORRALES, 2006; DIAZ-BATALLA *et al.*, 2006;

ESPINOSA-ALONSO *et al.*, 2006). Não obstante, o uso de diferentes metodologias de extração, como a aplicação de hidrólise para a quantificação dos ácidos fenólicos, poderia explicar tais diferenças.

Em geral, as concentrações de ácidos fenólicos aumentaram após o cozimento em todas as amostras, com exceção da cultivar BRS Timbó (amostra H), que mostrou uma redução em 11% e 18% no conteúdo de ácido clorogênico e ácido caféico, respectivamente após o tratamento térmico. As cultivares Canário CIFAC 92017 (amostra C) e o feijão preto FT Nobre (amostra G) apresentaram os maiores incrementos após cozimento (16%, 15% e 25%, 35%, respectivamente). Além disso, os conteúdos de ácidos fenólicos foram maiores nas cultivares cultivadas no litoral que nos feijões cultivados a maior altitude, como também foi observado no caso dos teores de fenólicos totais.

A hidrólise parcial, devido ao processo térmico pode resultar na liberação de derivados do ácido cinâmico dos conjugados como o ácido clorogênico (CLIFFORD, 2000), resultando em incremento do teor de ácido caféico nos feijões cozidos. Adicionalmente, o processo térmico pode promover vários fenômenos de difusão dentro da semente do feijão (ROCHA-GUZMAN *et al.*, 2007), o qual poderia facilitar a extração e a disponibilidade de ácidos fenólicos como o ácido clorogênico nas amostras cozidas.

5.3.1.3 Inibição da α -glicosidase e α -amilase

Todas as cultivares de feijão avaliadas apresentaram a capacidade de inibir a α -glicosidase de uma forma dose dependente antes e após o tratamento térmico (Figura 30).

Figura 30. Atividade inibitória da α -glicosidase (%) no feijão cru e cozido a três diferentes doses de amostra.

(a-e) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

Observaram-se atividades inibitórias moderadas nos feijões crus, que variaram entre 16 e 31%. As cultivares de cor de casca amarela (amostras A até D) e a cultivar de casca vermelha (amostra H) mostraram maior atividade inibitória entre todas as amostras. Além disso, as cultivares brancas (amostras E e F) foram as menos efetivas na inibição da atividade da α -glicosidase. A altitude de cultivo não teve influência sobre a capacidade de inibição da α -glicosidase entre as cultivares peruanas.

A atividade inibitória da α -glicosidase foi reduzida após o tratamento térmico em todas as cultivares de feijão (Figura 31). A cultivar Jalo Precoce (amostra J) apresentou a maior inibição da α -glicosidase (25%) entre os feijões cozidos e, além disso, foi a cultivar com as menores perdas na atividade inibitória (8%), quando comparada com os outros feijões, os quais apresentaram perdas entre 11 e 52%.

Figura 31. Atividade inibitória da α -glicosidase (%) e teor de fenólicos totais no feijão cru e cozido (10 mg de amostra).

(A-C) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).

(a-c) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

A correlação entre a atividade inibitória da α -glicosidase com os teores de fenólicos totais e com a capacidade antioxidante foi baixa, tanto entre os feijões crus quanto nos feijões cozidos (Tabela 23 e 24). McCUE *et al.* (2005) observou que altos teores de fenólicos totais nem sempre estão relacionados com elevadas atividades anti-glicosidase nos alimentos. Portanto, é provável que outros compostos não fenólicos estejam envolvidos nas propriedades inibitórias da α -glicosidase dos extratos aquosos do feijão.

A inibição da α -amilase foi significativamente elevada nos extratos aquosos dos feijões crus, mostrando uma tendência dose dependente (Figura 32). Em geral, as cultivares peruanas apresentaram as maiores atividades inibitórias da α -amilase pancreática que as cultivares brasileiras; porém, todas as cultivares exibiram atividades inibitórias maiores que 90% (100 mg de amostra), independentemente da altitude de cultivo.

Figura 32. Atividade inibitória da α -amilase (%) no feijão cru a três diferentes doses de amostra.

(a-b) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).

A Figura 33 apresenta o efeito do processo térmico sobre a atividade inibitória da α -amilase nos extratos de feijão em relação ao conteúdo de fenólicos totais. Observou-se uma redução significativa da atividade inibitória da α -amilase em todas as cultivares após o tratamento térmico. As perdas induzidas pelo cozimento foram o dobro (73-94%) das obtidas no caso da α -glicosidase. As cultivares BRS Tropical (amostra I) e Jalo Precoce (amostra J) tiveram as maiores atividades inibitórias da α -amilase entre os feijões cozidos (25 e 20%, respectivamente). Coincidentemente, a cultivar Jalo Precoce também exibiu a maior atividade inibitória da α -glicosidase após o tratamento térmico.

Figura 33. Atividade inibitória da α -amilase (%) e teor de fenólicos totais no feijão cru e cozido (100 mg de amostra).

(A-B) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).

(a-c) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

Nem o teor de fenólicos totais nem a capacidade antioxidante mostraram correlação com a atividade inibitória da α -amilase (Tabela 24). Vários estudos

relatam a presença de inibidores de natureza protéica no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Um inibidor da α -amilase denominado α AI-1 tem sido purificado e parcialmente caracterizado a partir de diferentes variedades de feijão comum, como o feijão branco (MARSHAL & LAUDA, 1975), vermelho (WILCOX & WHITAKER, 1984) e preto (LAJOLO & FINARDI FILHO, 1985). Além disso, outro inibidor, o α AI-2, com características estruturais similares ao α -AI-1, foi também detectado em feijões comuns (NAKAGUCHI *et al.*, 1997). Esses inibidores são glicoproteínas que parecem inibir as α -amilases da saliva e pancreáticas de uma forma não competitiva (MARSHAL & LAUDA, 1975). Portanto, a inibição da α -amilase pancreática exibida pelos extratos aquosos dos feijões crus, poderia estar relacionada com a presença de inibidores de natureza protéica. Não obstante, esses compostos foram significativamente sensíveis ao calor nas cultivares avaliadas, e parecem ter sido degradados após o tratamento térmico.

A correlação entre os teores de fenólicos totais e a atividade inibitória da α -amilase foi moderada, porém estatisticamente significativa após o processo térmico ($r=0,45$), indicando que a inibição da α -amilase nos feijões cozidos pode estar parcialmente associada tanto com os teores de fenólicos totais quanto com a presença de inibidores de origem protéica.

5.3.1.4 Inibição da enzima conversora da angiotensina I (ACE-I)

A figura 34 mostra a atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I nos feijões crus e tratados termicamente a três diferentes doses de amostra (2, 5 e 10 mg). Todos os extratos apresentaram a habilidade de inibir a ACE-I de uma forma dose dependente tanto antes quando após o tratamento térmico.

Figura 34. Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (%) no feijão cru e cozido a três diferentes doses de amostra.

(A-D) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cruas ($p < 0,05$).

(a-g) Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras cozidas ($p < 0,05$).

A atividade inibitória da ACE-I foi maior a 80% entre os feijões crus a uma dose de 10 mg de amostra (b.u.). Quando avaliadas menores doses de amostra (5 mg), as atividades inibitórias foram ainda significativamente elevadas (de 74 até

85%); no entanto, uma elevada variabilidade foi observada entre os resultados obtidos com 2 mg de amostra (de 0 até 76%). Observou-se que as cultivares peruanas foram mais efetivas na inibição da ACE-I mesmo que com menores doses avaliadas, independentemente da altitude de cultivo (71-76%, com 2 mg de amostra). Ao contrário, as cultivares procedentes do Brasil exibiram menores atividades inibitórias (55-67%) na mesma dose de amostra; porém, não foi detectada atividade inibitória da ACE-I na cultivar preta FT Nobre (amostra G) na menor dose avaliada.

Por outro lado, foi observado um aumento das atividades inibitórias da ACE-I após o tratamento térmico por autoclavagem em todas as cultivares. A inibição aumentou em média um 12% a 10 mg de amostra, sem mostrar muita variabilidade a 5 mg de amostra. Não obstante, na menor dose de amostra (2 mg), as cultivares peruanas cultivadas a menores altitudes foram as únicas que apresentaram um aumento significativo da atividade inibitória da ACE-I (de 7 até 20%). A atividade inibitória da ACE-I foi reduzida entre as cultivares cultivadas a maiores altitudes e nas cultivares BRS Tropical e Jalo Precoce (amostras I e J, respectivamente) quando menores doses de amostra foram avaliadas (2 mg) após o tratamento térmico. Convém ressaltar que a cultivar preta FT Nobre (amostra G) foi a única que apresentou atividades inibitórias da ACE-I a 10 mg de amostra. Isso poderia indicar algum tipo de relação entre a cor da casca do feijão e a eficácia na inibição da ACE-I. Porém, fatores genéticos, agrônômicos e ambientais podem também estar envolvidos.

Não foi encontrada correlação estatística positiva entre os teores de fenólicos totais, a capacidade antioxidante e as atividades inibitórias da ACE-I tanto entre os feijões crus quanto entre os cozidos. Igualmente, KWON *et al.* (2007) não encontraram correlação quando avaliaram feijões de outras espécies. Esses resultados sugerem que a importante atividade inibitória da ACE-I detectada nos feijões no presente trabalho parece estar associada com compostos não fenólicos, possivelmente peptídeos com funções biológicas ou efeitos fisiológicos. Muitos peptídeos com atividade inibitória da ACE-I têm sido detectados em hidrolisados enzimáticos procedentes de diferentes proteínas de origem alimentar.

LEE *et al.* (2000) relataram que a menor fração molecular (<10000 daltons) da proteína de feijão hidrolisada enzimaticamente apresentou uma elevada inibição da ACE. Além disso, LEE *et al.* (1999) purificaram um peptídeo bioativo com poder inibitório da ACE-I a partir de proteína hidrolisada de outra variedade de feijão. Em geral, as leguminosas que apresentam altos conteúdos de proteínas produzem vários peptídeos após a digestão enzimática, portanto apresentam maiores atividades inibitórias da ACE que os cereais (RHYU *et al.*, 1996). Os peptídeos podem ser liberados por proteólise durante o processo digestivo *in vivo* ou durante o processo térmico do alimento (MEISEL *et al.*, 1997; SMACCHI & GOBBETTI, 1998). Isso poderia explicar o aumento da atividade inibitória da ACE-I após o tratamento térmico observado nas cultivares de feijão avaliadas no presente trabalho.

5.3.2 Funcionalidade de grãos Andinos quanto ao seu potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo

5.3.2.1 Fenólicos totais, perfil de compostos fenólicos por CLAE e capacidade antioxidante

A Figura 35 mostra os teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante analisada através da porcentagem de inibição do radical livre DPPH• nos extratos aquosos dos grãos andinos avaliados.

Os teores de fenólicos totais nos extratos aquosos dos grãos cozidos variaram entre $0,8 \pm 0,07$ e 8 ± 1 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra (b.u.). O milho roxo (amostra 4) exibiu o maior teor de fenólicos totais (8 ± 1 mg/g b.u.), seguida pelas duas cultivares de lupino ($4,0 \pm 0,2$ e $4,1 \pm 0,3$ mg/g b.u. para as cultivares SLP-1 e H-6, respectivamente). Tanto a Kañiwa quanto a Quinoa (amostras 1 e 2, respectivamente) que pertencem à mesma família botânica *Chenopodium*, mostraram teores de fenólicos totais similares ($2,3 \pm 0,1$ e $2,8 \pm 0,1$ mg/g b.u., respectivamente). Por outro lado, as amostras de milho parcialmente

pigmentados (amostra 5 até 8) apresentaram teores muito baixos de fenólicos totais (de $0,9 \pm 0,1$ até $1,1 \pm 0,1$ mg/g b.u.)

Figura 35. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante dos grãos andinos
Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

A capacidade antioxidante variou entre 6 e 86% entre os grãos avaliados e a correlação com os teores de fenólicos totais foi moderada; porém, estatisticamente significativa ($r=0,53$, $p<0,05$) (Tabela 25). A Quinoa (amostra 2) apresentou a maior capacidade antioxidante entre os grãos, apesar dos teores de fenólicos totais terem sido menores aos obtidos para o milho roxo. Entretanto, a Kañiwa (amostra 1) e o milho roxo (amostra 4) apresentaram também capacidades antioxidantes importantes pouco menores que a Quinoa (75 e 77%, respectivamente).

Com exceção do milho roxo, a capacidade antioxidante entre as amostras de milho foi moderada (de 24 até 36%). As cultivares de lupino (amostras 9 e 10) mostraram tendências similares nos seus conteúdos de fenólicos totais. Porém, a habilidade de inibir o radical livre DPPH• foi maior na cultivar H-6 (42%) que na cultivar SLP-1 (24%). A Kiwicha (amostra 3), o pseudo-cereal que apresentou um

baixo teor de fenólicos totais, também exibiu a menor capacidade antioxidante (8%) entre os grãos.

Tabela 25. Coeficientes de correlação de Pearson para os teores de fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade inibitória da α -glicosidase e atividade inibitória da ACE-I de pseudo-cereais, cereais e leguminosas Andinas.

	CA ^a	GLIC ^a	ACE ^b
FT ^a	0.53*	0.60*	0.20
CA		0.50*	- 0.13
GLIC			- 0.09

* $p < 0,05$. ^a (n = 60). ^b (n = 40). FT: fenólicos totais; CA: capacidade antioxidante; GLIC: atividade inibitória da α -glicosidase (5 mg amostra); ACE: atividade inibitória da ACE-I (5 mg amostra).

A análise por CLAE permitiu detectar alguns compostos fenólicos individuais nos extratos aquosos dos grãos andinos cozidos, e os resultados são apresentados na Tabela 26. Os extratos procedentes das espécies de *Chenopodium* (amostras 1 e 2) apresentaram glicosídeos de quercetina. No milho roxo foi encontrado somente o ácido protocatecuico; enquanto que, baixos teores de ácido *p*-cumárico foram encontrados nos milhos 3 e 4 (amostras 6 e 7, respectivamente).

Tabela 26. Compostos fenólicos detectados por CLAE nos extratos aquosos dos grãos Andinos^a

Código	Nome comum	Composto fenólico (mg/100 g amostra b.u.)		
		Glicosídeos de quercetina	Ácido protocatecuico	Ácido <i>p</i> -cumárico
1	Kañiwa	94,3 ± 3,5	n.d	n.d
2	Quinoa	113,1 ± 5,6	n.d	n.d
4	Milho 1	n.d	28,7 ± 1,5	n.d
6	Milho 3	n.d	n.d	2,2 ± 0,1
7	Milho 4	n.d	n.d	3,4 ± 0,5

^aValores são médias ± DP. n.d: não detectado.

De acordo com os resultados apresentados, em geral, os teores de fenólicos totais nos grãos andinos foram proporcionais à suas capacidades antioxidantes, e esse fato parece estar associado à presença de compostos fenólicos específicos detectados por CLAE.

Entre os grãos andinos, o milho roxo (*Zea mays* L.) foi o grão mais relevante por seus altos teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante, seguido das leguminosas (*Lupinus mutabilis* Sweet) e dos pseudo-cereais Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) e Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd).

O milho roxo é um alimento que tem sido cultivado por muitos séculos na região dos Andes e, segundo vários estudos, o milho roxo é rico em antocianinas. Tradicionalmente no Peru, o milho roxo é consumido como uma bebida preparada por ebulção denominada “Chicha morada”, a qual tem sido associada com várias propriedades medicinais (BRACK-EGG, 1999). O conteúdo médio de antocianinas no milho roxo do Peru é de aproximadamente de 1640 mg/100 g (b.u.) (CEVALLOS-CASALS & CISNEROS-ZEVALLOS, 2003a), teor maior que o encontrado no mirtillo fresco (73-430 mg/100 b.u.) (MOYER *et al.*, 2002). Antocianinas como a cianidina-3-glicosídeo, a pelargonidina-3-glicosídeo e a peonidina-3-glicosídeo têm sido identificados em um extrato de milho roxo procedente do Peru. Porém, outros compostos fenólicos como glicosídeos de quercetina e derivados dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico tem também sido detectados (PEDRESCHI & CISNEROS-ZEBALLOS, 2007). Alguns estudos relatam que a elevada capacidade antioxidante observada no milho roxo está relacionada com seus altos teores de antocianinas (PEDRESCHI & CISNEROS-ZEBALLOS, 2006; DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006). No entanto, no presente trabalho, foi identificado somente ácido protocatecuico no extrato aquoso do milho autoclavado.

As antocianinas são muito sensíveis ao calor e podem ser facilmente transformadas à forma chalconas durante o tratamento térmico (WROLSTAD *et al.*, 2002). SADILOVA *et al.* (2006) reportaram que as reações de deglicosilação sucessiva constituem as etapas iniciais da degradação das antocianinas, quando aplicado um tratamento térmico em pH=1, resultando nas correspondentes

agliconas. Esses últimos compostos podem ser hidrolisados até um ácido fenólico ou um aldeído fenólico. Além disso, JING & GIUSTI (2007), observaram uma redução consistente da proteína a 100 °C no extrato aquoso de milho roxo, indicando uma possível denaturação das proteínas a elevadas temperaturas, o qual parece resultar na complexação e precipitação das antocianinas conduzindo a uma redução nos teores de antocianinas totais.

A cianidina-3-glicosídeo tem sido identificada como a maior antocianina presente no milho roxo, juntamente com suas formas aciladas (PASCUAL-TERESA *et al.*, 2002; DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Sob condições neutras e altas temperaturas, os glicosídeos de cianidina são consecutivamente hidrolisados até ácido protocatecuico, principalmente; não obstante, outros compostos menores como o ácido 2,4-dihidroxibenzóico e o ácido 2,4,6-trihidroxibenzóico são também formados (SEERAM *et al.*, 2001). Isso poderia explicar a detecção de ácido protocatecuico nos extratos aquosos de milho roxo autoclavado no presente trabalho.

Atualmente, o milho roxo está sendo comercializado no mercado nutracêutico na forma de extrato em pó. Esse produto é obtido mediante extração em solução aquosa de etanol a 60%, do milho roxo moído sendo posteriormente filtrado e liofilizado. Alguns estudos relatam que esse extrato em pó é rico em antocianinas com o potencial de possuir os efeitos terapêuticos associados a esses compostos (PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Porém, o milho roxo é ainda tradicionalmente consumido na forma de bebida preparada por ebulição do milho em água. De acordo com os resultados do presente trabalho, os elevados teores de fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos extratos aquosos do milho roxo cozido poderiam estar associados com a presença do ácido protocatecuico formado pela degradação das antocianinas durante o processo de autoclavagem.

O lupino andino ou *Lupinus mutabilis* Sweet, também conhecido como “lupino pérola” ou “tarwi”, é uma leguminosa que tem sido cultivada na região dos Andes desde tempos milenares. No presente trabalho, ambas as cultivares

avaliadas de *Lupinus mutabilis* Sweet (SLP-1 e H-6) mostraram altos teores de fenólicos totais associados com uma capacidade antioxidante moderada; porém, não foram detectados compostos fenólicos específicos por CLAE nos extratos aquosos. A capacidade antioxidante do lupino poderia também estar relacionada com a presença de outros compostos não fenólicos, provavelmente carotenóides solubilizados após o tratamento térmico. Carotenóides como a zeaxantina e o β -caroteno também têm sido detectados em sementes de *L. mutabilis* e *L. luteus*, em maiores concentrações que no *L. angustifolius* e o *L. albus* (ENTISAR & HUDSON, 1979). Adicionalmente, a habilidade dos carotenóides de seqüestrar radicais livres como o DPPH• tem sido reportada previamente (JIMENEZ-ESCRIG *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003).

A Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) é um dos cultivos mais antigos da região dos Andes, sendo cultivado pelo menos por 7000 anos (JACOBSEN *et al.*, 2003). Esse pseudo-cereal contém um alto teor de proteína e cresce em condições climáticas extremas, o que poderia ser importante para a diversificação de sistemas agrícolas em outras regiões como os Himalayas e as planícies do Norte da Índia (BHARGAVA *et al.*, 2006). Por outro lado, a Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) apresenta uma qualidade nutricional excepcional e contém elevados teores de ferro nas folhas e nas sementes (JACOBSEN *et al.*, 2003). DINI *et al.* (2004) reportaram a presença de caempferol, glicosídeos de quercetina e um glicosídeo do ácido vanílico na farinha integral de sementes de Quinoa variedade *Kancolla*. Similarmente, 10 glicosídeos de flavonóis, principalmente quercetina, isoramnetina e caempferol têm sido identificados na farinha integral de sementes de *Chenopodium pallidicaule* (RASTRELLI *et al.*, 1995). No presente trabalho, só as espécies de *Chenopodium* exibiram altos teores de glicosídeos de quercetina, o que poderia estar correlacionado com a elevada capacidade antioxidante observada nesses grãos. As propriedades antioxidantes da quercetina, relacionadas com a habilidade de seqüestrar radicais livres tem sido atribuída a sua estrutura química especial, que inclui uma ligação orto 3'-4'-dihidroxi no anel B, e à presença de uma dupla ligação nas posições 2 e 3 juntamente com a hidroxila na posição 3 no anel C (RICE-EVANS *et al.*, 1997).

Como os grãos de Quinoa e Kiwicha são comumente consumidos após um processo térmico, os resultados da presente pesquisa indicam pela primeira vez a presença de glicosídeos de quercetina nos grãos cozidos desse pseudo-cereal e seu potencial antioxidante, como seqüestradores de radicais livres.

De acordo com a literatura, as sementes de milho menos coloridas contêm ácidos fenólicos livres e esterificados. Assim, DEL POZO-INSFRAN *et al.* (2006) identificaram seis derivados do ácido ferúlico (8,9-81,6 mg/100 g b.u.), juntamente com a forma livre (248 mg/100 g b.u.), o ácido *p*-cumárico (0,66 mg/100 g b.u.), dois derivados do ácido protocatecuico (0,42 e 1,42 mg/100 g b.u.), e ácido gálico (0,39 mg/100 g b.u.) no milho branco após seu processamento como “nixtamal” (kernel cozido). Além disso, baixos teores de ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzóico, e ácido protocatecuico têm sido detectados no milho amarelo (0,37; 0,13 e 0,3 mg/100 g b.u., respectivamente) (SHAHIDI & NACZK, 1995). No presente trabalho, foram detectados baixos teores de ácido *p*-cumárico nos milhos parcialmente pigmentados após o tratamento térmico por autoclavagem.

5.3.2.2 Inibição da α -glicosidase, α -amilase e da enzima conversora da angiotensina I (ACE-I)

De acordo com a Figura 36, todos os extratos inibiram a α -glicosidase de uma forma dose dependente. As atividades inibitórias variaram entre 11 e 51% quando a dose avaliada de amostra foi de 5 mg (b.u.). O milho roxo apresentou a maior atividade inibitória com relação à α -glicosidase (51%), seguida pelo milho 3 (amostra 6, 40%) e a Quinoa (amostra 2, 30%). A Kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.), o pseudo-cereal com os mais baixos teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante, apresentou também a menor atividade inibitória da α -glicosidase (11%). As leguminosas apresentaram atividades inibitórias moderadas; não obstante, o lupino cultivar H-6 (amostra 10) teve maior atividade inibitória que a cultivar SLP-1 (26 e 19%, respectivamente). De acordo com as correlações de Pearson (Tabela 25), a atividade inibitória da α -glicosidase apresentou uma

correlação significativa tanto com os teores de fenólicos totais quanto com a capacidade antioxidante dos grãos avaliados.

Figura 36. Atividade inibitória da α -glicosidase (%) a três diferentes doses de amostra comparado com os teores de fenólicos totais nos grãos andinos. Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

A atividade inibitória da α -amilase foi também avaliada nas amostras; porém, não foi detectada atividade inibitória dessa enzima em todos os extratos.

Os resultados do presente trabalho indicam que os grãos andinos cozidos, especialmente o milho roxo, o milho amarelo com listras vermelhas (amostra 6) e a Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) apresentam potencial como alimentos com atividade inibitória da α -glicosidase, sem mostrar efeito sobre a α -amilase pancreática *in vitro*. Esse perfil implica em uma importante funcionalidade relacionada ao controle da absorção intestinal da glicose, com a vantagem de não

produzir efeitos colaterais associados com uma inibição elevada da α -amilase pancreática (MARTIN & MONTGOMERY, 1996).

A atividade inibitória da α -glicosidase foi significativamente proporcional aos teores de fenólicos totais e à capacidade antioxidante. No milho roxo e na Quinoa, a inibição da α -glicosidase parece estar relacionada com a presença de determinados compostos fenólicos como o ácido protocatecuico e os glicosídeos de quercetina, respectivamente. Estudos prévios realizados com extratos de ervas clonadas têm demonstrado que compostos fenólicos específicos apresentam elevadas atividades inibitórias da α -glicosidase *in vitro*. O ácido protocatecuico puro inibiu a α -glicosidase em 56%, seguido pela quercetina (37%); além disso, esses fenólicos não inibiram a α -amilase pancreática porcina (KWON *et al.*, 2006b).

O potencial do milho roxo para o controle da hiperglicemia e prevenção da obesidade e colesterol tem sido correlacionado principalmente com a presença de antocianinas como a cianidina-3-glicosídeo (TSUDA *et al.*, 2003; SASAKI *et al.*, 2007). Recentemente, a redução do colesterol e o aumento na capacidade antioxidante pelo consumo contínuo de milho roxo têm sido demonstrado em experimentos com ratos hipercolesterolêmicos (ARROYO *et al.*, 2007). Os resultados da presente pesquisa sugerem que o ácido protocatecuico, o maior produto de degradação dos glicosídeos de cianidina no milho roxo após o tratamento térmico, poderia também exercer um efeito positivo na prevenção da diabetes tipo 2 decorrente da hiperglicemia.

A Kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.), um grão andino altamente nutritivo (REPO-CARRASCO *et al.*, 2001) não apresentou resultado interessante em relação com seu potencial de inibir as enzimas chave relevantes para a modulação da diabetes tipo 2. Além disso, os grãos cozidos de Kiwicha mostraram baixos teores de fenólicos totais e a menor capacidade antioxidante entre todos os grãos andinos avaliados. CONFORTI *et al.* (2005) detectaram atividade inibitória da α -amilase *in vitro* em duas variedades de Kiwicha (Oscar Blanco e Victor vermelho; 51 e 28%, respectivamente a 25 μ g/mL). Não obstante, as análises nesse estudo foram realizadas em extratos de sementes cruas; isso poderia explicar as

diferenças dos resultados obtidos no presente estudo, quando um processo térmico foi aplicado previamente às análises dos extratos aquosos dos grãos de Kiwicha.

Em relação ao potencial dos grãos andinos de inibir a enzima conversora da angiotensina I (ACE-I), somente as leguminosas exibiram atividades inibitórias significativas a uma dose de 5 mg de amostra em (b.u.) (Figura 37); porém, não foi detectada atividade inibitória quando doses menores de amostra foram avaliadas. Ambas as cultivares de lupino apresentaram atividades inibitórias similares (52%). Entretanto, nem os teores de fenólicos totais nem a capacidade antioxidante tiveram correlação com as atividades inibitórias da ACE-I dos lupinos (Tabela 25).

Figura 37. Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (%) comparado com os teores de fenólicos totais nos grãos andinos.

Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

A importância nutricional do lupino encontra-se fundamentalmente no seu conteúdo elevado de proteínas, comparáveis aos apresentados pela soja. O *Lupinus mutabilis* apresenta um teor de proteína de 48% e 27% de lipídeos em base seca, similares aos encontrados nas sementes de soja, e maiores que os apresentados por outras leguminosas (SCHOENEGER *et al.*, 1982). YOSHIE-STARK *et al.* (2004) têm relatado que os isolados protéicos obtidos do *Lupinus albus* e seus hidrolisados inibiram a ACE-I *in vitro* entre 0,7 e 43,4% (150 µg/mL de amostra). Porém, os mesmos autores observaram mais tarde que as atividades inibitórias dos isolados protéicos de *Lupinus albus* diminuíram em 2,72% após o tratamento térmico a 125 °C (YOSHIE-STARK *et al.*, 2006). Os resultados da presente pesquisa indicam que o *Lupinus mutabilis* Sweet exibe uma atividade inibitória da ACE-I importante e, portanto, apresenta um potencial interessante na prevenção da hipertensão. A atividade inibitória da ACE-I parece estar mais relacionada com o conteúdo protéico ou a presença de certos peptídeos formados no lupino após o tratamento térmico, que com os compostos fenólicos. No entanto, mais estudos seriam necessários para confirmar a função da proteína do lupino na inibição da ACE-I.

5.4 CONCLUSÕES

5.4.1 Feijão e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo

- O tratamento térmico por autoclavagem mostrou uma influência significativa sobre os teores de fenólicos totais, os perfis de compostos fenólicos, a capacidade antioxidante e a funcionalidade *in vitro* relacionada com o potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo das cultivares de feijão do Peru e do Brasil avaliadas.
- Os teores de fenólicos totais foram reduzidos após o tratamento térmico; porém, compostos fenólicos específicos como o ácido clorogênico e o ácido caféico aumentaram em todas as cultivares; enquanto que a capacidade antioxidante aumentou especialmente entre as cultivares de feijão peruanas.
- Os feijões crus apresentaram elevadas atividades inibitórias da α -glicosidase e α -amilase. Não obstante, após o tratamento térmico a atividade inibitória da α -amilase foi reduzida significativamente, enquanto que a atividade inibitória da α -glicosidase diminuiu moderadamente após o cozimento.
- A atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I aumentou em todas as cultivares após o tratamento térmico.
- A altitude de cultivo apresentou um efeito significativo sobre os teores de fenólicos totais, capacidade antioxidante e atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I entre os feijões peruanos, sendo que essas características foram maiores nos feijões cultivados a baixas altitudes.
- Não existiu correlação estatística entre os teores de fenólicos totais e a atividade inibitória da α -glicosidase e α -amilase detectada nos feijões, indicando que outros compostos não fenólicos, possivelmente de natureza protéica, estejam envolvidos.
- As cultivares de feijão cozido avaliadas apresentam um potencial promissor na prevenção da hipertensão juntamente com uma elevada capacidade

antioxidante e elevados teores de ácidos fenólicos, o que poderia influenciar positivamente na prevenção das complicações macro ou microvasculares da diabetes associadas com uma disfunção oxidativa.

5.4.2 Grãos Andinos e potencial anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo

- O milho roxo (*Zea mays* L.) foi o cereal com o maior teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante e atividade inibitória da α -glicosidase, características possivelmente associadas com a presença de ácido proteocatecuico nesse cereal.
- Os pseudo-cereais como a Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) e Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), ricos em glicosídeos de quercetina, inibiram significativamente o radical livre DPPH• e apresentaram uma moderada atividade inibitória da α -glicosidase.
- As duas cultivares de leguminosas avaliadas (*Lupinus mutabilis* Sweet SLP-1 e H-6) foram as únicas amostras que inibiram significativamente a enzima conversora da angiotensina I.
- Não foi detectada atividade inibitória da α -amilase em todos os grãos andinos cozidos avaliados.
- Esses estudos *in vitro* sugerem que a modulação dos níveis de glicose, hipertensão e o status oxido-redução para a prevenção da diabetes tipo 2 e suas complicações, sem produzir efeitos colaterais associados com uma elevada inibição da α -amilase, poderiam ser controladas com uma combinação apropriada de cereais, pseudo-cereais e leguminosas andinas, como parte da dieta tradicional.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da incidência de DCNT como a diabetes tipo 2 e complicações cardiovasculares associado entre outros fatores às atuais mudanças nos hábitos alimentares tradicionais fazem necessária a busca de novas estratégias nos diferentes campos de estudo visando à solução desse problema. Pesquisas relacionadas com a caracterização de compostos bioativos de alimentos tradicionais como os diferentes grãos estudados no presente trabalho, poderiam constituir uma base científica preliminar para estudos mais profundos com os alimentos interessantes desde o ponto de vista funcional e dessa forma, contribuir nas estratégias para a diminuição das DCNT.

Os resultados *in vitro* do presente trabalho proporcionam uma base bioquímica muito importante para estudos *in vivo* posteriores. Assim, de acordo com os resultados obtidos para as diferentes cultivares de feijão avaliadas, os feijões de cor preta, jalo e tipo carioca apresentaram teores e perfis interessantes de compostos fenólicos antioxidantes tanto antes quanto após o tratamento térmico, sendo que a capacidade antioxidante e a atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I, relevante na prevenção da hipertensão aumentaram após o cozimento do feijão. Estudos posteriores poderiam explorar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos majoritários nas cultivares de feijão selecionadas e confirmar seu potencial anti-hipertensivo em estudos com animais ou em ensaios clínicos. Entre os diversos grãos andinos avaliados, o extrato aquoso de milho roxo cozido, destacou-se por sua elevada capacidade antioxidante e pela inibição significativa da α -glicosidase, enzima relevante na prevenção da hiperglicemia. Portanto, projetos futuros poderiam envolver ensaios *in vivo* que avaliem o efeito do consumo contínuo desse alimento no status oxido-redução celular e na prevenção da hiperglicemia.

Dessa forma, ainda mais pesquisas seriam necessárias para confirmar o potencial antioxidante, anti-hiperglicêmico e anti-hipertensivo determinado no presente estudo nos diferentes grãos tradicionalmente consumidos em países da América Latina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. ASSOCIATION OFFICIAL OF ANALITICAL CHEMISTS, 2000. Grains, 945.38, 925.09. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=27433>. Acesso em 15 março de 2008.
- ABOU EL HASSAN, M. A. I.; TOUW, D. J.; WILHELM, A. J.; BAST, A.; VAN DER VIJGH, W. J. F. Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration. **Int. J. Pharm.**, v. 211, p.51-56, 2000.
- ANI, V.; NAIDU, A. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/botter cumin *Centratherum anthelminticum* L. Kuntze seeds. **Eur. Food Res. Technol.**, Dresden, v. 226, p.897-903, 2008.
- APARICIO-FERNÁNDEZ, X.; GARCÍA-GASCA, T.; YOUSEF, G. G.; LILA, M. A.; GONZÁLEZ DE MEJIA, E.; LOARCA-PIÑA, G. Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 54, p.2116-2122, 2006.
- APARICIO-FERNANDEZ, X.; MANZO-BONILLA, L.; LOARCA-PIÑA, G. F. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 70, p.73S-78S, 2005b.
- APARICIO-FERNÁNDEZ, X.; YOUSEF, G. G.; LOARCA-PIÑA, G.; DE MEJIA, E.; LILA, M. A. Characterization of polyphenolics in the seed coat of black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food. Chem.**, Washington D. C., v. 53, p.4615-4622, 2005a.

- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. Agric. Food. Chem.**, Washington D. C., v. 52, p.1124-1131, 2004.
- ARRIGO, A. P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 27, p.936-944, 1999.
- ARROYO, J.; RAEZ, E.; RODRIGUEZ, M.; CHUMPITAZ, V.; BURGA, J.; DE LA CRUZ, W.; VALENCIA, J. Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo cronico de maiz morado (*Zea mays* L.) en ratas hipercolesterolemicas. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Pub.**, Lima, v. 24, p.157-162, 2007.
- ARTS, I. C. M.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 81, p.317S-325S, 2005.
- ARTS, I. C. W. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 138, p.1561S-1566S, 2008.
- ASCHNER, P. Diabetes trends in Latin America. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, Rome, v. 18, p.27S-31S, 2002.
- AZEVEDO, L.; GOMES, J. C.; STRINGHETA, P. C.; GONTIJO, A. M. M. C.; PADOVANI, C. R.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as protective agent against DNA damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, Richmond, v. 41, p.1671-1676, 2003.
- BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Burundi. **Food Chem.**, Oxford, v. 47, p.159-167, 1993.

- BARCELÓ, A. R.; MUÑOZ, R. Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in *Lupinus*. **Phytochem.**, Amsterdam, v. 28, p.1331-1333, 1989.
- BARREIRO, E.; DE LA PUENTE, B.; MINGUELLA, J.; COROMINAS, J. M.; SERRANO, S.; HUSSAIN, S. N. A.; GEA, J. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 171, p.1116-1124, 2005.
- BARTSCH, H.; NAIR, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. **J. Langenbeck's Arch. Surg.**, Berlin, v. 391, p.499-510, 2006.
- BAZZANO, L. A.; HE, J.; OGDEN, L. G.; LORIA, C.; VAPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P. K. Legume consumption and risk of coronary hearth disease in US men and women. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v. 161, p.2528. 2001.
- BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 51, p.7879-7883, 2003.
- BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Flavonol glycosides from the seed coat of a new manteca-type dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 46, p.2906-2910, 1998.
- BENNET, R. N.; WALLSGROVE, R. M. New phytologist, Tansley Review No 72, v. 127, p.617-633, 1994.
- BERMUDEZ, O. I.; TUCKER, K. L. Trends in dietary patterns of Latin American populations. **Cad Saúde Publica**, São Paulo, v. 19, p.87S-99S, 2003.

- BHARGAVA, A.; SHUKLA, S.; OHRI, D. *Chenopodium quinoa*-an Indian perspective. **Ind. Crops Prod.**, v. 23, p.73-87, 2006.
- BISCHOFF, H. Pharmacology of glucosidase inhibitor. **Eur. J. Clin. Invest.**, Vienna, v. 24, p.3-10, 1994.
- BISCHOFF, H.; PULS, W.; KRAUSE, H. P.; SCHUTT, H.; THOMAS, G. Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAY m 1099 (miglitol) and BAY o 1248. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, Sydney, v.1, p.53-57, 1985.
- BORS, W.; MICHEL, C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 957, p.57-69, 2002.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons, Inc., New York, p.306-322, 1978.
- BRACK-EGG, A. Zea mays L. Em: Diccionario enciclopédico de plantas utiles del Peru, Imprenta del centro Bartolome de las Casas, Cusco, Peru, p.537-538, 1999.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. - Wiss. Technol.**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, Boston v. 56, p.317-333, 1998.
- BRESSANI, R.; ELIAS, I. G.; ABRAHAM, J. E. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. **J. Plant Foods**, v. 4, p.43-46, 1982.

- BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Antinutrients and “*in vitro*” availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chem.**, Oxford, v. 98, p.85-89.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. **Diabetes**, Boston, v. 54, p.1615-1625, 2005.
- BUNEA, A.; ANDJELKOVIC, M.; SOCACIU, C.; BOBIS, O.; NEACSU, M.; VERHÉ, R.; VAN CAMP, J. Total and individual carotenoids and phenolic acids contents in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Food Chem.**, Oxford, v. 108, p.649-656, 2008.
- BUTLER, L. G.; PRICE, M. L.; BROTHERTON, J. E. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 30, p.1087-1090, 1980.
- CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; LOARCA-PIÑA, G. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B₁. **Food Addit. Contam.**, London, v. 19, p.62-69, 2002.
- CARRASCOSA, M.; PASCUAL, F.; AREST, S. Acarbose-induced acute severe hepatotoxicity. **Lancet**, London v. 349, p.698-699, 1997.
- CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. A comparative study of antimicrobial, antimutagenic and antioxidant activity of phenolic compounds from purple corn and bilberry colorant extracts. Em: Book of abstracts of the Institute of Food Technologist technical program abstracts, IFT Press, Chicago, p.20, 2003b.

- CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweet potato. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 51, p.3313-3319, 2003a.
- CHARPENTIER, G.; RIVELINE, J. P.; VARROUD-VIAL, M. Management of drugs affecting blood glucose in diabetic patients with renal failure. **Diabetes Metab.**, v. 26, p.73-85, 2000.
- CHEBIL, L.; HUMEAU, C.; ANTHONI, J.; DEHEZ, F.; ENGASSER, J-M.; GHOUL, M. Solubility of flavonoids in organic solvents. **J. Chem. Eng. Data**, v. 52, p.1552-1556, 2007.
- CHENG, D. Prevalence, predisposition and prevention of type 2 diabetes. **Nutr. Metab.**, New York, v. 2, p.29-41, 2005.
- CHOUNG, M. G.; CHOI, B. R.; AN, Y. N.; CHU, Y. H.; CHO, Y. S. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 51, p.7040-7043, 2003.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food Agric.**, Davis, v. 80, p.1033-1043, 2000.
- CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. **J. Food Sci. Agric.**, v. 80, p.1118-1125, 2000.
- CONFORTI, F.; STATTI, G.; LOIZZO, M. R. SACCHETTI, G.; POLI, F.; MENICHINI, F. In vitro antioxidant effect and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p.1098-1102, 2005.

- CROOK, E. D.; PENUMALEE, S. Therapeutic controversies in hypertension management: angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin receptor blockers in diabetic nephropathy? ACE Inhibitors. **Ethn. Dis.**, v. 14, p.1S-4S, 2004.
- DA SILVA, R. J. M.; LAUREANO, O.; BEIRÃO DA COSTA. M. L. Total phenol and proanthocyanidin evaluation of *Lupinus* species. Proceedings of the VIIth internacional lupin conference, Évora, Portugal, p.250-254, 1993.
- DE MEJIA, E. G.; GUZMAN-MALDONADO, S. H.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, E.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M. M.; CASTELLANOS, J. Z.; KELLY, J. D. Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v., 51, p.5962-5966, 2003.
- DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; SALDIVAR, S. O. S.; TALCOTT, S. T. Polyphenolic and antioxidante content of White and blue corn (*Zea mays* L.) products. **Food Res. Int.**, v. 39, p.696-703, 2006.
- DEMBINSKA-KIEC, A.; MYKKÄNEN, O.; KIEC-WILK, B.; MYKKÄNEN, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. **Br. J. Nutr.**, Southampton, v. 99, p.109ES-117ES, 2008.
- DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K. K.; LIU, R. H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 50, p.3010-3014, 2002.
- 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.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 54, p.2045-2052, 2006.

DICARLI, M. F.; JANISSE, J.; GRUNBERGER, G.; AGER, J. Role of chronic hyperglucemia in the pathogenesis of coronary microvascular dysfunction in diabetes. **J. Am. Coll. Cardiol.**, San Diego, v. 41, p.1387-1393, 2003.

DINI, I.; SCHETTINO, O.; DINI, A. Studies on the constituents of *Lupinus mutabilis* (Fabaceae). Isolation and characterization of two new isoflavonoid derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 46, p.5089-5092, 1998.

DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Nutritional and antinutritional composition of *Kancolla* seeds: an interesting and underexploited Andean food plant. **Food Chem.**, Oxford, v. 92, p.125-132, 2005.

DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Phenolic constituents of *Kancolla* seeds. **Food Chem.**, Oxford, v. 84, p.163-168, 2004.

DOLECKOVÁ-MARESOVÁ, L.; PAVLIK, M.; HORN, M.; MARES, M. De novo design of α -amylase inhibitor: a small linear mimetic of macromolecular-proteinaceous ligands. **Chem. Biol.**, Cambridge, v. 12, p.1349-1357, 2005.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, p.446-452, 2006.

DZAU, V. J. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. **Hipertens.**, v. 37, p.1047-1052, 2001.

- ECDCDM (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 25, p.5S-20S, 2002.
- ENTISAR, A. E.; HUDSON, B. J. F. Identification and estimation of carotenoids in the seed of four lupin species. **J. Sci. Food Agric.**, Davis, v. 30, p.1168-1170, 1979.
- 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.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 54, p.4436-4444, 2006.
- FAOSTAT. Core consumption data, 2005. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/346/DesktopDefault.aspx?PageID=346>. Acesso em 10 julho de 2008.
- FERRER, M. A.; PEDREÑO, M. A.; CALDERÓN, A. A.; MUÑOZ, R.; BARCELÓ, A. R. Distribution of isoflavones in lupin hypocotyls. Possible control of cell wall peroxidase activity involved in lignification. **Physiol Plantarum.**, Lund, v. 79, p.610-616, 1990.
- FERRIERES, J. The French paradox: lessons for other countries. *Heart*, v. 90, p.107-111, 2004.
- FUKUI, H.; EGAWA, H.; KOSHIMIZU, K. A new isoflavone with antifungal activity from immature fruits of *Lupinus luteus*. **Agr. Biol. Chem.**, Tokio, v. 37, p.417-421, 1973.
- GAGNON, H.; IBRAHIM, R. K. Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. **Phytochem.**, Amsterdam, v. 44, p.1463-1467, 1997.

- GAGNON, H.; TAHARA, S.; BLEICHERT, E.; IBRAHIM, R. K. Separation of aglucones, glucosides and prenylated isoflavones by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 606, p.255-259, 1992.
- GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health *implications* of dry beans: a review. **J. Am. Col. Nutr.**, Clearwater, v. 13, p.549-558, 1994.
- GENOVESE, M. I.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soy bean varieties. **Food. Sci. Tech. Int.**, v. 11, p. 205-211, 2005.
- GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 39, p.67-69, 2003.
- GODBOUT, A; CHIASSEON J-L. Who should benefit from alpha-glucosidase inhibitors?. **Curr. Diabetes. Rep.**, Newcastle, v. 7, p.333-339, 2007.
- GONÇALVES, J. S.; SOUZA, S. A. M. Gangorra de preços: a produção e o abastecimento de feijão na safra 1997/98 no estado de São Paulo. **Inf. econom.**, São Paulo, v. 28, p.60-65, **1998**.
- GRANITO, M.; BRITO, Y.; TORRES, A. Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus*. **J. Sci. Food Agric.**, Davis, v. 87, p.2801-2809, 2007.
- GUZMAN-MALDONADO, H.; CASTELLANOS, J.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chem.**, Oxford, v. 55, p.333-335, 1996.

- HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (taninns) as biological antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 46, p.1887-1892, 1998.
- HANEFELD, M. Cardiovascular benefits and safety profile of acarbose therapy in prediabetes and established type 2 diabetes. **Cardiovas. Diabetol.** Tel-Aviv,, v. 6, p.1-10, 2007.
- HANGEN, L.; BENNIK, M. R. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris* L.) reduced azomethane-induced colon cancer in rats. **Nutr. Cancer**, Mahwah, v. 44, p.60-65, 2002.
- HARBORNE, J. B. Methods in plants biochemistry, Em: plant phenolics. Academic Press, London, 1989.
- HARRIS, M. I.; ZIMMER, P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Em: International Textbook of Diabetes Mellitus, John Wiley, London, p.3-18, 1992.
- HEIMLER, D.; VIGNOLINI, P.; DINI, M. G.; ROMANI, A. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. **J. Agric. Food. Chem.**, Washington D. C., v. 53, p.3053-3056, 2005.
- HEMPEL, J.; BÖHM, H. Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green French beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 44, p.2114-2116, 1996.
- HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACBURN, H.; BUZINA, R.; FRIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B. S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P.

- C. H.; KATTAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.155, p.381-386, 1995.
- HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. **J. Sci. Food Agric.**, Davis, v. 81, p.842-852, 2001.
- HORII, S.; FUKASSE, K.; MATSUO, T.; KAMEDA, K.; ASANO, N.; MASUI, Y. Synthesis and α -D—glucosidase inhibitor activity of N-substituted valiolamine derivatives as potent oral antidiabetic agents. **J. Med. Chem.**, v. 29, p.1038-1046, 1987.
- IBARZ, A.; GONZÁLEZ, C.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Kinetic models for water adsorption and cooking time in chickpea soaked and treated by high pressure. **J. Food Eng.**, Davis, v. 63, p.467-472, 2004.
- JACOBSEN, S. E.; MUJICA, A.; ORTIZ, R. The global potencial for Quinoa and other Andean crops. **Food Rev. Inter.**, Philadelphia, v.19, p.139-148, 2003.
- JARAMILLO-FLORES, M. E.; GONZALEZ-CRUZ, L.; CORNEJO-MAZON, M.; DORANTES-ALVAREZ, L.; GUTIERREZ-LOPEZ, G. F.; HERNADEZ-SANCHEZ, H. Effect of thermal treatment on the antioxidant activitu and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). **Food Sci. Tech. Int.**, v. 9, p. 271-277, 2003.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; SAURA-CALIXTO, F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl. **J. Sci. Food Agric.**, Davis, v. 80, p.1686-1690, 2000.
- JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; HERNÁDEZ-SÁNCHEZ, H.; ALVAREZ-MANILLA, G.; ROBLEDO-QUINTOS, N.; MARTINEZ-HERRERA, J.; DÁVILA-ORTIZ, G. Effect of

aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. **J. Sci. Food Agric.**, Davis, v. 81, p.421-428, 2001.

JING, P.; GIUSTI, M. M. Effects of extraction conditions on improving the field and quality of an anthocyanins-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 72, p.363C-368C, 2007.

JOHNSTON, J-I.; VOLHARD, F. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system fro cardiovascular control. **J. Hypertens.**, Milan, v. 10, p.13-26, 1992.

JUNG, M.; PARK, M.; CHUL, H.L.; KANG, Y.; SEOK-KANG, E.; KI-KIM, S. Antidiabetic agents from medicinal plants. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, p.1-16, 2006.

KATAGIRI, Y.; IBRAHIM, R. K.; TAHARA, S. HPLC analysis of white lupin isoflavonoids. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p.1118-1125, 2000.

KHATUN, M.; EGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T. Effect of the thermal treatment on radical-scavenging activity of some spices. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 12, p. 178-185, 2006.

KOPLATEC, Y.; OTTO, K.; BÖHM, V. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 53, p.5640-5646, 2005.

KÖRNER, C. Alpine plant life. Em: Functional plant ecology of high mountain ecosystems, Springer, Berlin, p.58-85, 1999.

KWON, Y-I.; APOSTOLIDIS, E.; KIM, Y-C.; SHETTY, K. Health benefits of tradicional corn, beans and pumpkin: In vitro studies for hyperglycemia and hipertensión Management. **J. Med. Food**, La Jolla, v. 10, p.266-275, 2007.

- KWON, Y.-I.; EMMANOUIL, A.; SHETTY, K. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. **J. Food Biochem.**, Magalia, v. 32, p.15-31, 2008.
- KWON, Y.-I.; JANG, H. D.; SHETTY, K. Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type 2 diabetes and hypertension. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, Taiwan, v. 15, p.425-432, 2006a.
- KWON, Y.-I.; VATTEM, D. V.; SHETTY, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, Taiwan, v. 15, p.107-118, 2006b.
- KYLE, W. S. A. The current and potential uses of lupins for human food. Proceedings of the first Australian Lupin Technology Symposium, Perth, Australia, p.89-97, 1994.
- LAJOLO, F. M.; FINARDI-FILHO, F. Partial characterization of the amylase inhibitor of black bean (*Phaseolus vulgaris*) variety Rico. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 33, p.132-138, 1985.
- LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigation. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 81, p. 284S-291S, 2005.
- LAMPART-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; TROJANOWSKA, K.; NOGALA-KALUCKA, M.; MALECKA, M.; PACHOLEK, B. Chemical composition and antibacterial activities of lupin seeds extracts. **Nahrung Food**, v. 47, p. 286-290, 2003.
- LEE, H. G.; YANG, C. B.; KWON, Y. S.; SHIN, H. K. Purification and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from small red bean protein hydrolysate. **Food Sci. Biotech.**, v. 9, p.292-296, 2000.

- LEE, J. H.; OZCELIK, B.; MIN, D. B. Electron donation mechanisms of β -carotene as a free radical scavenger. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 68, p.861-865, 2003.
- LETERME, P.; MUÑOZ, C. Factors influencing pulse consumption in Latin America. **Brit. J. Nutr.**, Southampton, v. 88, p.S251-S254, 2002.
- LIEBERMAN, J. Elevation of serum angiotensin I-converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. **Am. J. Med.**, v. 59, p.365-372, 1975.
- LINDGÄRDE, F.; ERCILLA, M. B.; CORREA, L. R.; AHRÉN, B. Body adiposity, insulin and leptin in subgroups of Peruvian Amerindians. **High Alt. Med. Biol.**, v. 5, p.27-32, 2004.
- LINDHOUT, P.; DANIAL, D.; PARLEVLIET, J. Introduction: focusing on breeding for durable disease resistance of the Andean highland food crops. **Euphytica**, v. 153, p.283-285, 2007.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 134, p.3479S-3485S, 2004.
- LOMBARD, K.; PEFFLEY, E.; GEOFFRIAU, E.; THOMPSON, L.; HERRING, A. Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. **J. Food Comp. Anal.**, Rome, v. 18, p.571-581, 2005.
- LOPEZ-HERNANDEZ, J.; VAZQUEZ-ODERIZ, L.; VAZQUEZ-BLANCO, E.; ROMERO-RODRIGUEZ, A.; SIMAL-LOZANO, J. HPLC determination of major pigments in the bean *Phaseolus vulgaris*. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 41, p.1613-1615, 1993.
- LOWELL, B. B.; SHULMAN, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, Washington D.C., v. 307, p.384-387, 2005.

- LUSCHER, T. F.; STEFFEL, J. Sweet and sour: unraveling diabetic vascular disease. **Circ. Res.**, v. 102, p.9-11, 2008.
- LUTHRIA, D. L.; PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **J. Food Comp. Anal.**, Rome, v. 19, p.205-211, 2006.
- MA, Y.; BLISS, F. A. Tannins content and inheritance in common bean. **Crop Sci.**, v. 18, p.201-204, 1978.
- MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular disease. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 16, p.77-84, 2005.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 79, p.727-747, 2004.
- MARKHAM, K. R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. Em : Techniques of flavonoids identification, Academic Press, London, p.36-51, 1982.
- MARSHAL, J. J.; LAUDA, C. M. Purification and propeties of phaseolamin, na inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v. 250, p.8030-8037, 1975.
- MARTIN, A.; MONTGOMERY, P. Acarbose: an alpha-glucosidase inhibitor. **Am. J. Health System Pharm.**, v. 53, p.2277-2290, 1996
- MATSON, S. The cookability of yellow pear: a colloid chemical and biochemical study. **Acta Agric. Suecana II**, Stockholm, v. 2, p.185-231, 1946.

- MATSUI, T.; OGUNWANDE, I. A.; ABESUNDARA, K. J. M.; MATSUMOTO, K. Anti-hyperglycemic potential of natural products. **Mini-Ver. Med. Chem.**, v. 6, p.349-356, 2006.
- MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 133, p.933S-940S, 2003.
- MAZUR, W. M.; DUKE, J. A.; WÄHÄLÄ, K.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H. Isoflaonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **J. Nutr. Biochem.**, v. 9, p.193-200, 1998.
- MCCLEAN, P. E.; LEE, R. K.; OTTO, C.; Gepts, P.; Bassett, M. J. Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Hered.**, v. 93, p.148-152, 2002.
- MCCUE, P.; KWON, Y-I.; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. **J. Food Biochem.**, Magalia, v. 29, p.278-294, 2005.
- MEISEL, H.; GOEPFERT, A.; GÜNTHER, S. ACE-inhibitory activities in milk products. **Milchwis-senschaft.**, v. 52, p.307-311, 1997.
- MONDINI, L.; MONTEIRO, C. A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). **Rev. Saúde Publ.**, São Paulo, v. 28, p.433-439, 1994.
- MOREL, Y.; BAROUKI, R. Repression of gene expression by oxidative stress. **Biochem. J.**, v. 342, p.481-496, 1999.

- MORELLO, J. R., MOTILVA, M. J.; TOVAR, M. J.; ROMERO, M. P. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage with special emphasis on the phenolic fraction. **Food Chem.**, Oxford, v. 85, p.357-364, 2004.
- MOSCOSO, W.; BOURNE, M. C.; HOOD, L. F. Relationships between the hard-to-cook phenomenon in red kidney beans and water absorption, puncture force, pectin, phytic acid, and minerals. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 49, p.41-51, 1984.
- MOYER, R.A.; HUMMER, K. E. ; FINN, C. E. ; FREI, B. ; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 50, p.519-525, 2002.
- NA, H-K.; SURTH, Y-J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the Green tea polyphenol EGCG. **Food Chem. Tox.**, v. 46, p.1271-1278, 2007.
- NAKAGUCHI, T.; ARAKAWA, T.; PHILO, J. S.; WEN, J.; ISHIMOTO, M.; YAMAGUCHI, H. Structural characterization of an α -amylase inhibitor from a wild common bean (*Phaseolus vulgaris*): Insight into the common structural features of leguminous α -amylase inhibitors. **J. Biochem.**, Suita, v. 121, p.350-354, 1997.
- NATHAN, D. M.; MEIGS, J. B.; SINGER, D. E. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is...or is it?. **Lancet**, London, v. 350, p. 4S-9S, 1997.
- NEGISHI, H.; XU, J-W.; IKEDA, K.; NJELEKELA, M.; NARA, Y.; YAMORI, Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 134, p.38-42, 2004.

- NICHOLSON, S. K.; TUCKER, G. A.; BRAMELD, J. M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 67, p.42-47, 2008.
- NICOLI, M. C.; ARESE, M.; MANZOCCO, L.; LERICI, C. R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, London, v.30, p.292-297, 1997a.
- NICOLI, M. C.; ARESE, M.; PARPINEL, M. T.; FRANCESCHI, S.; LERICI, C. R. Study on loss and-or formation of antioxidants during processing and storage. **Can. Lett.**, v. 114, p.71-74, 1997b.
- NOGUCHI, C.; NIKKI, E. Phenolics antioxidants. A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 28, p.1538-1546, 2000.
- OOMAH, B.D.; TIGER, N.; OLSON, M.; BALASUBRAMANIAN, P. Phenolics and antioxidative activities in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.). **Plant. Foods Hum. Nutr.**, v. 61, p.91-97, 2006.
- OTTAVIANI, J. I.; ACTIS-GOURETTA, L.; VILLORDO, J. J.; FRAGA, C. G. Procyanidin structures defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. **Biochemie**, v. 88, p.359-365, 2006.
- PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. **J. Sci. Food Agric.**, Davis, v. 82, p.1003-1006, 2002.
- PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 54, p.4557-4567, 2006.

- PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chem.**, Oxford, v. 100, p.956-963, 2007.
- PEDROSA, M. M.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; AYET, G.; MUZQUIZ, M. Levels of non-nutrient compounds in dietary legumes. Em: COST 98 Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. Directorate-General Science, Research and Development, Chapter 14, v. 4, p. 75-81, 1996.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidant. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p.1035-1042, 2000.
- PRICE, K. R.; COLQUHOUN, I. J.; BARNES, K. A.; RHODES, M. J. C. Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during processing. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 46, p.4898-4903, 1998.
- PRICE, M. L.; VAN SCOYOC, S.; BUTTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 26, p.1214-1216, 1978.
- PUJOLA, M.; FARRERAS, A.; CASAÑAS, F. Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chem.**, Oxford, v. 102, p.1034-1041, 2007.
- PUTNAM, D. H. History and prospects for lupins in the upper Midwest. Em: Prospects for lupins in North America. Proceedings of a Symposium at the Center for Alternative Plant and Animal, St Paul, Minnesota, p.3390, 1991.
- RAKIC, S.; PETROVIC, S.; KUKIC, J.; JADRANIN, M.; TESEVIC, V.; POVRENOVIC, D.; SILER-MARINKOVIC, S. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. **Food Chem.**, Oxford, v. 104, p.830-834, 2007.

- RANDHIR, R.; VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Antioxidant enzyme response studies in H₂O₂-stressed porcine muscle tissue following treatment with Oregano phenolic extracts. **Process Biochem.**, v. 40, p.2123-2134, 2005.
- RASTRELLI, L.; SATURNINO, P.; SCHETTINO, O.; DINI, A. Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 43, p.2020-2024, 1995.
- REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S. E. Valor nutricional y usos de la Quinoa (*Chenopodium quinoa*) y de la Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Em: Memorias primer taller internacional sobre Quinoa-recursos genéticos y sistemas de producción. Universidad Nacional la Agraria, Lima, p391-400, 2001.
- RHYU, M. R.; NAM, Y. J.; LEE, H. Y. Screening of angiotensin-I converting enzyme inhibitors in cereals and legumes. **Food Sci. Biotech.**, v. 5, p.334-337, 1996.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p.152-158, 1997.
- RICH, P. R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p.1095-1105, 2003.
- RIVERA, J.A.; BARQUERA, S.; CAMPIRANO, F.; CAMPOS, I.; SAFDIE, M.; TOVAR, V. Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic disease and obesity. **Public Health Nutr.**, v. 14, p.113-122, 2002.
- ROCHA-GUZMAN, 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 Chem.**, Oxford, v. 100, p.31-35, 2007.

- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Noções sobre experimentos fatoriais. Em: Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa do Pão Editora, São Paulo, Brasil, p.95-133, 2005.
- ROMANI, A.; VIGNOLINI, P.; GALARDI, C.; MULINACCI, N.; BENEDETTELLI, S.; HEIMLER, D. Germoplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 52, p.3838-3842, 2004.
- ROSETTI, I.; GIACARRI, A.; DEFRONZO, R. A. Glucose toxicity. **Diabetes Care**, v. 13, p.610-630, 1990.
- SADILOVA, E.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 71, p.504C-512C, 2006.
- SALINAS-MORENO, Y.; ROJAS-HERRERA, L.; SOSA MONTES, E.; PÉREZ-HERRERA, P. Anthocyanin composition in black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Mexico. **Agrocienc.**, v. 39, p.385-394, 2005.
- SALMANOWICZ, B. Primary structure and polymorphism of 2S albumins from seeds of Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). **Eur. Food Res. Tech.**, v.209, p.416-422, 1999.
- SARR, M.; CHATAIGNEAU, M.; MATINS, S.; SCHOTT, C.; EL BEDOUI, J.; OAK, M-H. ; MULLER, B.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hipertensión and endotelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. **Card. Res.**, v. 71, p.794-802, 2006.
- SASAKI, R.; NISHIMURA, N.; HOSHINO, H.; ISA, Y.; KADOWAKI, M.; ICHI, T.; TANAKA, A.; NISHIUMI, S.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; HORIO, F.; TSUDA, T. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to

downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, p.1619-1627, 2007.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 81, p.215S-217S, 2005a.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 45, p.287-306, 2005b.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 130, p.2073S-085S, 2000.

SCHOENEBERGER, H.; GROSS, R.; CREMER, H. D.; ELMADFA, I. Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 112, p.70-76, 1982.

SCHOENEBERGER, H.; GROSS, R.; CREMER, H. D.; ELMADFA, I. Composition and proteína quality o *Lupinus mutabilis*. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 112, p.70-76, 1982.

SEERAM, N. P.; BOURQUIN, L. D.; NAIR, M. G. Degradation products of cyanidin glucosides from tart cherries and their bioactivities. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 49, p.4924-4929, 2001.

SEOK-MOON, J.; SO-YOUNG, K.; DONG-RYUL, K.; SEONG-CHUN, J.; NAM, K. C.; AHN, D. U.; SEUNG-CHEOL, L. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 52, p.3389-3393, 2004.

SEUNG-CHEOL, L.; SEOK-MOON, J.; SO-YOUNG, K.; NAM, K. C.; AHN, D. U. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 53, p.1495-1498, 2005.

- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc., Lancaster, p.9-42, 1995.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, United States, p.1-15, 2004.
- SHETTY, K.; CURTIS, O. F.; LEVIN, R. E. WIKOWSKY, R.; ANG, W. Prevention of verification associated with *in vitro* shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. **J. Plant Physiol.**, v. 147, p.447-451, 1995.
- SHETTY, K.; WAHLQVIST, M. L. A model for the role of proline-linked pentose phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, Taiwan, v. 13, p1-24, 2004.
- SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) seed extracts. **Food Chem.**, Oxford, v. 101, p. 10-19, 2007.
- SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, M. D.; MAGNI, C.; MORANDI, S.; D'AGOSTINA, A.; ARNOLDI, A. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 134, p.18-23, 2004.
- SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin-I converting enzyme. **Enz. Microb. Tech.**, v. 22, p.687-694, 1998.
- SOSULSKI, F. W.; DABROWSKI, J. D. Composition of free and hydrolysable phenolic acids in the flours and hulls of ten legume species. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 32, p.131-133, 1984.

- SPITALER, R.; SCHLORHAUFER, P. D.; ELLMERER, E. P.; MERFORT, I.; BORTENSCHLAGER, S.; STUPPNER, H.; ZIDON, C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. **Phytochem.**, Amsterdam, v. 67, p.409-417, 2006.
- STUART, A. R.; GULVE, E. A.; WANG, M. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. **Chem. Rev.**, v. 104, p.1255-1282, 2004.
- TAHARA, S.; INGHAM, J. L.; NAKAHARA, S.; MIZUTANI, J.; HARBORNE, J. B. Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. **Phytochem.**, Amsterdam, v. 9, p.1889-1999, 1984.
- TAKEOKA, G. R.; D'ÁO, L. T.; FULL, G. H.; WONG, R. Y.; HARDEN, L. A.; EDWARDS, R. H.; BERRIOS, J. DE J. Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 45, p.3395-3400, 1997.
- TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p.200-207, 2002.
- THUDNATKORN, J.; LIU, H. Antioxidant activity of processed table beets (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) and green beans (*Phaseolus vulgaris*). **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 52, p.2659-2670, 2004.
- TOMMASINI, S.; RANERI, D.; FICARRA, R.; CALABRO, M. L.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β -cyclodextrin. **J. Pharmaceut. Biomed. Anal.**, v. 35, p.379-387, 2004.
- TSALIKI, E.; LAGOURI, V.; DOXASTAKIS, G. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus* ssp. *Graecus*). **Food Chem.**, Oxford, v. 65, p.71-75, 1999.

- TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 133; p.2125-2130, 2003.
- VALENCIA, A.; MORAN, J. Reactive oxygen species induce different cell death in cultured neurons. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 36, p.1112-1125, 2004.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Inter.**, v. 160, p.1-40, 2006.
- VIDAVALUR, R.; OTANI, H.; SINGAL, P.K.; MAULIK, N. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. **Exp. Clin. Cardiol.**, v. 11, p.217-225, 2006.
- VINDIOLA, O. L.; SEIB, P. A.; HOSENEY, R. C. Accelerated development of the hard-to-cook state in beans. **Cer. Food World**, v. 31, p.538-552, 1986.
- VITA, J. A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 81, p.292S-297S, 2005.
- WANG, C.; SHERRARD, M.; PAGADALA, S.; WIXON, R.; SCOTT, R. A. Isoflavone content among maturity group 0 to II soy beans. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 77, p.483-487, 2000.
- WHO. Global strategy on diet, physical activity and health. Annual report, Geneva, Switzerland, p.1-2, 2006.
- WILCOX, E. R.; WHITAKER, J. R. Structural features of red kidney bean α -amylase inhibitor important in binding with α -amylase. **J. Food Biochem.**, Magalia, v. 8, p.189-213, 1984.

- WILSON, P. W.F.; D'AGOSTINO, R. B.; PARISE, H.; SULLIVAN, L.; MEIGS, J. B. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. **Circulation**, v. 112, p.3066-3072, 2005.
- WORTHINGTON, V., ed. Alpha amylase. Em: Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, p.36-41, 1993.
- WORTHINGTON, V., ed. Maltase- α -glucosidase. Em: Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, p.261, 1993.
- WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; GIUSTI, M. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Analysis of anthocyanins in nutraceuticals. Em: Quality management of nutraceuticals, American Chemical Society, Washington D. C., p.42-62, 2002.
- 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. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 73, p.19H-27H, 2008.
- YOSHIE-STARK, Y.; BEZ, J.; WADA, Y.; WÄSCHE, A. Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 52, p.7681-7689, 2004.
- YOSHIE-STARK, Y.; BEZ, J.; WÄSCHE, A. Effect of different pasteurization conditions on bioactivities of *Lupinus albus* protein isolates. **L. W. T. Food Sci. Tech.**, v. 39, p.118-123, 2006.
- ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **J. Agric. Food Chem.**, Washington D. C., v. 48, p.2008-2016, 2000.