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

**Participação dos polissacarídeos de parede celular no fenômeno de
endurecimento de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) - cv Carioca-Pérola**

Tânia Misuzu Shiga

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientador:
Prof. Titular Franco M. Lajolo

São Paulo
2003

TÂNIA MISUZU SHIGA

**Participação dos polissacarídeos de parede celular no
fenômeno de endurecimento de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) -
cv Carioca-Pérola**

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Prof. Titular Franco Maria Lajolo/Presidente

Prof. Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo / 1º examinador

Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri / 2º examinador

Profa. Dra. Ursula Marquez Lanfer / 3º examinador

Profa. Dra. Tullia M. C.C. Filisetti / 4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2003

*Qualquer tempo é tempo
A hora mesma da morte
é hora de nascer.*

*Nenhum tempo é tempo
Bastante para a ciência
de ver, rever.*

*Tempo, contratempo
anula-se, mas o sonho
resta, de viver.*

(Qualquer - Carlos Drummond de Andrade)

Ao amigo Eduardo Villar que nos momentos de
dificuldade me apoiou e incentivou a prosseguir e,
acima de tudo, mostrou o real significado das
palavras coragem e perseverança

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho, houve momentos em que cogitei desistir. Não obstante, a relutância em deixar um projeto inacabado e o apoio de amigos sempre me fizeram retornar. O imenso prazer no estudo e a convivência com todos compensaram as dificuldades e muito me acrescentaram nestes anos. Também pude perceber a dimensão de minha ignorância e o quanto necessitava e ainda necessito crescer.

Sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Franco Lajolo de quem obtive confiança, apoio e conhecimento. Também à Prof^a. Beatriz Cordenunsi, que além de me proporcionar a oportunidade de aprender e trabalhar, sempre apontou novos caminhos, oferecendo sugestões valiosas. Meu muito obrigado aos professores do Departamento de Alimentos principalmente aos Profs. João Roberto, Elizabeth Menezes, Maria Inés, Eduardo Purgatto e Alfredo Tenuta.

Recorri ao auxílio inestimável de grupos que me acolheram com boa vontade. Assim, agradeço ao Prof. Paolo de Mascio e a Clécio do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, que cederam gentilmente a utilização do espectrômetro de massa. Aos membros do Departamento de Botânica, em especial, ao Prof. Marcos Silveira Buckeridge, à Cláudia e Clóvis por cederem material, tempo e atenção na execução dos ensaios enzimáticos. À Kátia, pela ajuda com o IV.

Agradeço aos membros do Departamento de Alimentos da USP, em especial a Alberto pela sua natureza singela. Com carinho, à Marisa, Paty, Alexandra e Eliana, pela companhia, cumplicidade e altruísmo e à Prof^a Tullia pela amizade e ajuda. Sou muito grata à Malu, minha companheira de bancada pela paciência, sempre me cedendo um espacinho a mais. Também, à Catarina, Tânia, Mônica, Benê, Elaine e Jorge pela paciência e imensa ajuda em meio à correria que os fiz passar. Muito obrigada à Márcia e Lúcia que me prestaram auxílio inestimável, contribuindo de mil maneiras com este trabalho. Aos que jamais negaram ajuda e sempre foram solícitos: Inés, Maurício, Eduardo e Adair. Com ternura, à Priscila pelo ombro amigo e um carinho especial àquelas que sempre estiveram presentes nos momentos mais simples e bem-humorados: Joana e Lurdinha. Pela companhia e descontração, agradeço a Ricardo, Ana Cris, Marcinha, Rosecler e Janaína. Obrigada a todos que conviveram comigo e partilharam alegrias e tristezas, vitórias e derrotas, ou mesmo, momentos simples de distração: Guillermo, Ana Paula, Adriana, Estela, Jack, Neusa, Gisele, Anderson...

Neste período, também tive a felicidade de conviver com pessoas que me brindaram com carinho e amizade. A Duda que me faz raciocinar sobre minhas muitas falhas e sempre teve palavras de encorajamento, otimismo e bom-humor. A Rodolfo pela amizade pura de menino e a José e Fina que me acolheram com carinho e bondade, consolando nos momentos de tristeza. À minha mãe, pois sei de todas as suas dificuldades. Ao meu irmão, que sempre foi o esteio da família e, mesmo sendo tão jovem, acabou sendo um pai para mim. Agradeço à Merit por ter me poupado de muitas dores nas costas e me garantido melhor saúde.

Aos que primeiro acreditaram em mim e moldaram meu caminho apresentando-me ao cálculo e ao raciocínio, meu muito obrigado.

Agradeço aos que me julgaram com bondade e mesmo àqueles que não o fizeram. Se apesar de tudo ainda tive dificuldades, digo que na dificuldade encontramos novos caminhos e testamos os limites de nossa capacidade.

Por fim, agradeço a Deus, pela vida e oportunidade de aprender e peço desculpas caso tenha me esquecido de alguém

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1	CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DA CULTIVAR CARIOCA-PÉROLA.	2
2.2	QUALIDADE NUTRICIONAL DO FEIJÃO HTC	3
2.3	DIFERENÇAS ENTRE <i>HARD-TO-COOK</i> (HTC) E <i>HARD-SHELL</i> (HS).....	4
2.4	IMPORTÂNCIA DA TEXTURA	5
2.4.1	<i>Fatores que influenciam a textura.</i>	7
2.4.2	<i>Desestruturação dos polímeros da parede celular e sua relação com a textura.</i>	9
2.5	ESTRUTURA DOS CARBOIDRATOS.....	10
2.6	A ARQUITETURA DA PAREDE CELULAR.....	12
2.6.1	<i>Celulose e Hemicelulose.</i>	13
2.6.2	<i>Polissacarídeos pécticos.</i>	14
2.6.3	<i>Proteína e compostos fenólicos</i>	16
2.6.4	<i>Ligações cruzadas.....</i>	17
2.7	MECANISMOS PROPOSTOS PARA EXPLICAR O FENÔMENO HTC.	21
2.7.1	<i>Complexo pectina-cátion-fitato.</i>	21
2.7.2	<i>O papel das membranas.....</i>	25
2.7.3	<i>Reações enzimáticas e não enzimáticas.</i>	25
2.7.4	<i>O papel dos compostos fenólicos e a teoria da lignificação.</i>	28
2.7.5	<i>Teorias envolvendo os materiais de reserva no processo de endurecimento.</i>	30
2.7.6	<i>Absorção de água</i>	34
2.7.7	<i>Os múltiplos mecanismos de ação.</i>	35
3	OBJETIVOS.....	38
4	MATERIAIS	39
4.1	AMOSTRA:	39
4.2	MATERIAIS ESPECIAIS E REAGENTES:	39
5	MÉTODOS.....	40
5.1	UMIDADE.....	40
5.2	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	41
5.2.1	<i>Determinação de fibras.....</i>	41

5.3	TEMPO DE COCÇÃO	41
5.4	EXTRAÇÃO DOS POLÍMEROS DA PAREDE CELULAR.....	41
5.4.1	<i>Obtenção dos polímeros de parede celular.....</i>	41
5.4.2	<i>Fracionamento da fração insolúvel em água (FIA).....</i>	42
5.4.3	<i>Fracionamento dos polissacarídeos da fração solúvel em água (FSA).....</i>	43
5.5	ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS.....	45
5.5.1	<i>Hidrólise ácida dos polissacarídeos.</i>	45
5.5.2	<i>Determinação de ácidos urônicos (AU).....</i>	45
5.5.3	<i>Determinação de açúcares totais (AT).....</i>	45
5.5.4	<i>Determinação de açúcares neutros por cromatografia em fase gasosa</i>	46
5.5.5	<i>Análise de ligações</i>	48
5.5.6	<i>Análise de açúcares por HPLC</i>	51
5.5.7	<i>Tratamento enzimático.....</i>	51
5.5.8	<i>Perfil de pesos moleculares dos polissacarídeos.....</i>	52
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1	COMPOSIÇÃO DO FEIJÃO.....	54
6.1.1	<i>Proporção de polímeros extraídos.....</i>	54
6.2	COMPOSIÇÃO DOS POLÍMEROS DA CASCA	55
6.2.1	<i>Composição de monossacarídeos</i>	55
6.2.2	<i>Perfil de ligações dos polissacarídeos da casca.....</i>	57
6.3	COMPOSIÇÃO DOS POLÍMEROS DO COTILÉDONE.....	58
6.3.1	<i>Polissacarídeos da FSA do cotilédone.....</i>	60
6.3.2	<i>Polissacarídeos da FIA do cotilédone</i>	61
6.3.3	<i>Perfil de monossacarídeos</i>	63
6.3.4	<i>Perfil de pesos moleculares das frações polissacarídicas.</i>	64
6.3.5	<i>Perfil de ligações</i>	65
6.4	EFEITOS DO ARMAZENAMENTO E DA COCÇÃO SOBRE OS NUTRIENTES.....	70
6.5	EFEITOS DA COCÇÃO E DO ENVELHECIMENTO NA ESTRUTURA POLIMÉRICA DA PAREDE CELULAR DO COTILÉDONE.	72
6.6	EFEITOS DA COCÇÃO E DO ENVELHECIMENTO NA ESTRUTURA POLIMÉRICA DA PAREDE CELULAR DA CASCA.....	75
6.7	ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS	76
6.7.1	<i>Cascas</i>	76
6.7.2	<i>Cotilédone</i>	76
6.7.3	<i>Avaliação dos efeito da cocção sobre feijões normais e HTC.....</i>	78

6.7.4	<i>Fracionamento dos polissacarídeos solúveis em água (FSA).....</i>	81
6.7.5	<i>Efeitos nos polissacarídeos do FIA.....</i>	87
6.7.6	<i>Efeito do envelhecimento e da cocção sobre o grau de polimerização dos polissacarídeos.....</i>	90
6.7.7	<i>Alteração na composição de monossacarídeos das frações polissacarídicas....</i>	93
6.8	EFEITOS DO ENVELHECIMENTOS NA ESTRUTURA DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR.	96
6.8.1	<i>Casca.....</i>	96
6.8.2	<i>Cotilédone.</i>	97
6.8.3	<i>Análise de ligação das frações tratadas enzimaticamente</i>	102
7	CONCLUSÕES	116
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
	ANEXOS	I

TABELAS

<i>Tabela 1:</i>	<i>Composição do cotilédone e da casca de feijão Carioca-Pérola.</i>	54
<i>Tabela 2:</i>	<i>Análise de ligações dos polissacarídeos das fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) da casca de feijões controle.....</i>	57
<i>Tabela 3:</i>	<i>Composição de açúcares e polissacarídeos dos polímeros contidos na fração solúvel em água (FSA) da parede celular do cotilédone de feijão.....</i>	60
<i>Tabela 4:</i>	<i>Composição de açúcares e polissacarídeos dos polímeros contidos na fração insolúvel em água (FIA) da parede celular do cotilédone de feijão.</i>	62
<i>Tabela 5:</i>	<i>Análise de ligações dos polissacarídeos das fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) do cotilédone de feijões controle.....</i>	66
<i>Tabela 6:</i>	<i>Tempo de cocção de feijões novos e envelhecidos.....</i>	71
<i>Tabela 7:</i>	<i>Comparação entre as composição centesimal de amostras cruas e cozidas de feijão Carioca-Pérola.....</i>	71

FIGURAS

Figura 1: Alteração na coloração da casca de feijões c.v. IAC Carioca, observada após o armazenamento a 30°C / 75%UR durante períodos de 3, 6 e 9 meses.....	7
Figura 2: Reação de β -eliminação observado na degradação de pectinas durante o processamento hidrotérmico de vegetais (KEIJETS & PILNIK, 1995).	10
Figura 3: Estrutura da celulose (A) e do xiloglicano; fragmento XXXG (B) e XXLG (C) e XXFG (D), mostrando diferentes tipos de ligação, estrutura de cadeia e ramificação.....	13
Figura 4: Estrutura química das pectinas presentes em dicotiledôneas e monocotiledôneas não-comelinóides.....	15
Figura 5: Estrutura formada pela coordenação dos cátions Ca^{2+} com os grupamentos -COO ⁻ de homogalacturonanos compondo “zonas de junção” (A) e em forma de “caixa de ovos”(B).	18
Figura 6: Ligações cruzadas em pectinas e proteínas estruturais.	19
Figura 7: Representação dos vários tipos de ligações químicas presentes em plantas.	20
Figura 8: Modelo demonstrando a contribuição das principais enzimas em estudos envolvendo endurecimento de leguminosas.	26
Figura 9: Modelo de mecanismo de múltiplos canais, mostrando eventos sequenciais que levam ao HTC em leguminosas..	36
Figura 10: Dissacarídeos substituídos por feruloil éster, encontrados em pectina de espinafre.....	37
Figura 11: Fluxograma de extração, fracionamento e análise das frações polissacarídicas da parede celular.....	44
Figura 12: Hidrólise e acetilação de açúcares neutros.....	48
Figura 13: Passos da preparação de acetato de alditol parcialmente metilado.	50
Figura 14: Curva de calibração da coluna de Sepharose CL4B, usada para determinação do peso molecular dos polissacarídeos obtidos da parede celular..	53
Figura 15: Conteúdo dos polímeros da fração insolúvel em água (FIA) e da fração solúvel em água na composição do feijão.....	55
Figura 16: Composição de monossacarídeos dos polímeros da parede celular da casca de feijão.	56
Figura 17: Composição de monossacarídeos dos polímeros da parede celular do cotilédone de feijão.....	59
Figura 18: Modelo apresentando os principais componentes do RGI.	68

Figura 19: Figura representativa mostrando alguns dos polissacarídeos presentes na parede celular feijão.....	70
Figura 20: Rendimento de fração insolúvel em água (FIA) e da fração rica polissacarídeos solúveis em água (FSA), obtido mediante a extração enzimático-química da farinha obtida do cotilédono de feijões controle e armazenados a 35°C/75% UR, crus e cozidos, (n ≥ 3).	73
Figura 21: Rendimento de fração insolúvel em água (FIA) e da fração rica polissacarídeos solúveis em água (FSA), obtido mediante a extração enzimático-química da farinha obtida da casca de feijões controle e armazenados a 35°C/75% UR.	75
Figura 22: Composição em carboidratos da fração insolúvel em água (FIA) e da fração solúvel em água (FSA) da casca de feijões novos e envelhecidos.	76
Figura 23: Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédono de feijões crus e cozidos.	78
Figura 24: Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédono de feijões novos e envelhecidos.	79
Figura 25: Perfil de eluição da FSA de feijões novos e envelhecidos crus em coluna de troca aniônica (Q-Sepharose FastFlow, Pharmacia), eluído com gradiente de NaCl.82	
Figura 26: Perfil de eluição da FSA de feijões novos e envelhecidos cozidos em coluna de troca aniônica (Q-Sepharose FastFlow, Pharmacia), eluído com gradiente de NaCl.	83
Figura 27: Alteração na composição de açúcares dos polímeros obtidos da fração solúvel em água (FSA) de feijões com o envelhecimento. Valores apresentados em porcentagem relativa.	84
Figura 28: Alteração na composição de açúcares dos polímeros obtidos da fração solúvel em água (FSA) de feijões com o cozimento (amostras normais e envelhecidas)86	
Figura 29: Representação da hidrólise das pectinas por β -eliminação em amostras normais com produção de oligômeros ácidos formados pelas porções ramificadas de alto peso molecular compostas por polissacarídeos neutros.	87
Figura 30: Perfil de fracionamento obtido através da extração da fração insolúvel em água (FIA), consecutivamente com CDTA e gradiente de NaOH.....	89
Figura 31: Efeito do envelhecimento sobre o peso molecular das frações.	90
Figura 32: Efeito do cozimento sobre o peso molecular das frações.....	92
Figura 33: Perfil de açúcares das frações obtida do FIA de feijões novos e envelhecidos cozidos. Valores apresentados em μ g de açúcar por mg de farinha de cotilédono.	94

Figura 34: <i>Análise da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) do tegumento de feijões novos e envelhecidos.</i>	96
Figura 35: <i>Análise de ligações dos polissacarídeos da fração solúvel em água (FSA) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses.</i>	97
Figura 36: <i>Análise de ligações dos polissacarídeos da fração solúvel em CDTA (FCDTA) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses.</i>	98
Figura 37: <i>Análise de ligações dos polissacarídeos da fração solúvel em água (FSA) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses, obtido após separação por cromatografia de troca aniônica.</i>	99
Figura 38: <i>Análise de ligações dos polissacarídeos da frações solúveis em base fraca (FBF), de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses.</i>	100
Figura 39: <i>Análise de ligações dos polissacarídeos da frações solúveis em NaOH 4M (H4) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses.</i>	101
Figura 40: <i>Análise da fração solúvel em água (FSA), rica em xiloglicanos, obtidos após a hidrólise do material com celulase de Trichoderma sp.</i>	103
Figura 41 <i>Análise da fração solúvel em CDTA (FCDTA), rica em xiloglicanos, obtidos após a hidrólise do material com celulase de Trichoderma sp.</i>	107
Figura 44: <i>Análise da fração solúvel em água (FSA), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG).</i>	110
Figura 45: <i>Análise da fração solúvel em CDTA (FCDTA), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG).</i>	111
Figura 46: <i>Análise da fração solúvel em base fraca (FBF), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG).</i>	112
Figura 47: <i>Análise da fração solúvel em NaOH 4M (H4), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG).</i>	113
Figura 48: <i>Comprimento da cadeia polimérica (A) e porcentagem de ramificação dos arabinanos (B) da fração insolúvel em álcool em amostras tratadas com celulase</i>	114

QUADROS

<i>Quadro 1: Alterações na composição de monossacarídeos da FSA e FIA em feijões com o envelhecimento e as mudanças provocadas em seu comportamento frente à cocção.</i>	81
<i>Quadro 2: Resumo das principais alterações no peso molecular dos polissacarídeos de parede celular</i>	92

ANEXOS

TABELAS

- Tabela A 1:** Distribuição de peso molecular das frações pécticas da parede celular de feijão cru e cozido obtidas através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose CL4B. **II**
- Tabela A 2:** Composição de açúcares e polissacarídeos dos polímeros contidos na fração solúvel em água (FSA) e na fração insolúvel em água (FIA) da parede celular da casca de feijão. **VII**
- Tabela A 3:** Composição de monossacarídeos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de feijões novos e envelhecidos crus e cozidos. **VIII**

FIGURAS

- Figura A 1:** Cromatografia de exclusão molecular da fração solúvel em água (FSA) e em CDTA (FCDTA) de feijões Carioca –Pérola. **I**
- Figura A 2:** rendimento de fração insolúvel em água (FIA) e da fração polissacarídica solúvel em água (FSA) de feijões novos e envelhecidos em amostras cruas e cozidas. **II**
- Figura A 3:** Perfil de eluição dos polímeros provenientes das enzimas utilizadas na extração da parede celular de feijão. **III**
- Figura A 4:** Perfil de açúcares dos polímeros encontrados nas enzimas utilizadas na extração de parede celular de feijão. **III**
- Figura A 5:** Composição de açúcares dos polímeros obtidos da fração solúvel em água (FSA) de feijões novos e envelhecidos, crus e após cocção. **IV**
- Figura A 6:** Composição em carboidratos do FIA e da FSA da casca de feijões novos e envelhecidos. **IV**
- Figura A 7:** Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédone de feijões crus novos e envelhecidos. **V**
- Figura A 8:** Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédone de feijões cozidos novos e envelhecidos. **V**
- Figura A 9:** Perfil de fracionamento da fração insolúvel em água (FIA) do cotilédone de feijões novos e envelhecidos. **VI**
- Figura A 10:** Relação entre monossacarídeos da fração insolúvel em água de feijões envelhecidos, descontado o conteúdo de glicose. **VI**

Figura A 11: Perfil de açúcares das frações obtida do FIA de feijões novos e envelhecidos. **IX**

Figura A 12: Perfil de cromatografia de massa por electrospray (ESI), das frações FBF(A) e H4(B), tratadas com celulase. **X**

Figura A 13: Perfil de cromatografia de massa por electrospray (ESI), das fração H4(B), tratadas com celulase. **X**

ABREVIATURAS

AAPM –	Acetato de alditol parcialmente metilado
AGII –	Arabinogalactano tipo II
CDTA –	Ácido 1, 2-diaminociclohexano N, N, N', N'tetracético
CG –	Cromatógrafo a gás
DMSO –	Dimetilssulfóxido
EDTA –	Ácido etilenodiaminotetracético
EIS-MS	Espectrômetro de massas com ionização por electrospray
EPG –	Endopoligalacturonase
FSA –	Fração solúvel em água
GAX –	Glicuronoarabinoxilanos
GC-EIMS –	Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa de impacto de elétrons
ha –	Hectare, relativo a 10 mil m ²
HGA –	Homogalacturonano.
HPLC –	Cromatografia a líquido de alto desempenho
HS –	Hard-shell: defeito textural relacionado à casca das sementes de leguminosa.
HTC –	Hard-to-cook; defeito textural, relacionado à qualidade de cocção e aos cotilédones. Defeito textural atribuído às sementes de leguminosas utilizadas na alimentação humana e animal.
FIA –	Material celular, relativo aos polímeros insolúveis em água e fortemente ligados resultantes do tratamento enzimático-químico.
MS –	Espectrômetro de massa
MWCO –	<i>Molecular weight cut off</i> (Banda de corte de peso molecular)
PAGE –	(<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>) eletroforese em gel de poliacrilamida.
PG –	Poligalacturonano
PME –	Pectinometilesterase
RGI e RGII –	Ramnogalacturonano tipo I e tipo II
TFA –	ácido trifluoroacético
UR –	Umidade relativa

UV –	Ultravioleta
XG –	Xiloglicano
XGA –	Xilogalacturonano

NOMENCLATURA DOS CARBOIDRATOS

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC)

Ram, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **AGal**, ácido galacturônico.

A numeração prévia à abreviação refere-se às posições na cadeia carbônica nos quais o açúcar encontra-se ligado na cadeia polissacarídica, por exemplo: 3,5-araf; significa uma arabinose que se encontra ligada no oxigênio dos carbonos 3 e 5.

A notação “**t**” refere-se a um açúcar terminal, ligado apenas pelo oxigênio do carbono 1 (C-1) (*e.g.* *t*-xilp, xilopiranose ligada pelo C-1). As notações “**p**” e “**f**” referem-se a piranose e furanose, respectivamente.

A ligação do C-1 não é citada, embora esteja presente (*e.g.* 5-araf, é 1,5-ligada), visto que na molécula encontra-se comprometida com a ciclização.

ArapentaOAc: arafpentaacetilada.

Letra código	Estrutura representada	Mnemônico
G	β -D-Glcp	Glicose
X	α -D-Xilp-(1-6)- β -D-Glcp	Xilose
L	β -D-Galp-(1-2)- α -D-Xilp-(1-6)- β -D-Glcp	Galactose
F	α -L-Fucp-(1-2)- β -D-Galp-(1-2)- α -D-Xilp-(1-6)- β -D-Glcp	Fucose

Quadro contendo a nomenclatura sistemática criada por Fry *et al.* (1993)

RESUMO

O feijão é um alimento nutritivo amplamente consumido no Brasil, porém, apresenta facilidade para desenvolver o defeito textural hard-to-cook (HTC) que torna as sementes resistentes ao amaciamento por cocção e provoca perdas econômicas e nutricionais. A maciez, um atributo importante nos grãos, proporciona melhor aceitabilidade do produto pelo consumidor, melhor qualidade nutricional e organoléptica e menor gasto de tempo e combustível no preparo. Devido à importância da parede celular na textura dos alimentos, foram investigadas alterações na estrutura e composição de seus polissacarídeos causada pelo HTC. Com este intuito, feijões Carioca-Pérola foram armazenados por 8 meses à 30°C / 75% UR e amostras cruas e cozidas tiveram suas paredes celulares extraídas através de tratamento enzimático-químico, produzindo uma fração solúvel em água (FSA) e outra insolúvel, denominada fração insolúvel em água (FIA). A FIA foi fracionada resultando em polímeros solúveis em solução de quelante de CDTA (FCDTA), base fraca (FBF) e álcali 4M (H4). A FSA foi separada em coluna de troca aniônica e os polímeros assim obtidos foram tratados com celulase e endopoligalacturonase e analisados quanto ao conteúdo de açúcares, peso molecular e natureza das ligações através de cromatografia em fase gasosa e a líquido e por espectrometria de massa. Os resultados revelaram que 75% da parede celular do cotilédone é constituída pelas frações FSA, H4 e FCDTA, ricas em arabinanos ramificados de elevado peso molecular, contendo pequenas quantidades de xiloglicanos (XG), arabinogalactanos tipo II (AGII), galactanos, ramnogalacturonanos (RG) e xilogalacturonanos (XGA). As cascas dos feijões eram compostas por xilanos, celulose, XG, arabinanos e por pequena quantidade de RG. As sementes HTC possuem menor quantidade de polissacarídeos solúveis em água (FSA) e em solução de CDTA (FCDTA) e maior quantidade de material insolúvel em água (FIA), principalmente, polímeros da fração H4. Os feijões normais perdem grande quantidade de material péctico durante a cocção através da despolimerização e solubilização das pectinas hidrossolúveis (FSA) e, principalmente, pela solubilização dos polissacarídeos provenientes da fração H4, entretanto, a perda de material péctico em amostras HTC é mínima. Os feijões envelhecidos podem apresentar menor grau de metil esterificação das pectinas, que impediria a despolimerização. A redução na solubilidade dos polímeros da fração H4 pode estar relacionada com a perda de ramificação dos arabinanos e xiloglicanos resultando em polissacarídeos com cadeias mais lineares, que causam alinhamento das cadeias e formação de interações do tipo ponte de H, tornando os polímeros menos solúveis. O aumento de XGA e AU nas frações pécticas da FSA, bem como na FCDTA e FBF reforçam a suposição.

ABSTRACT

Beans is a nourishing food source widely consumed in Brazil. However, they show tendency to develop easily the textural defect named Hard-to-cook (HTC) that becomes the seeds resistant to softening by cooking, causing economical and nutritional losses. Softness is an important quality attribute of pulses that increases acceptability by consumer and provides better nutritional and organoleptical qualities that results in less time and fuel spent. Because the importance of the cell wall to the food texture, changes in its polysaccharide structure and composition were investigated during the development of HTC. With this aim, Carioca-Pérola beans were stored for 8 months at 30°C / 75% RH and raw and cooked samples have had the cell wall extracted by enzymatic-chemical treatment, producing a water soluble fraction (FSA) and a water insoluble fraction, named water insoluble fraction (FIA). The FIA was fractionated, producing CDTA soluble polymers, weak base soluble polymers (FBF) and 4M alkali-soluble fraction (H4). The FSA was separated using anion exchange chromatography. All fractions obtained were treated with cellulase and endopoligalacturonase and analyzed for sugar content, molecular weight and sugar linkage using gas and liquid chromatography and mass spectrometry. The results revealed that FSA; H4 and CDTA fractions composed 75% of the cell wall material. These fractions were rich in high molecular weight branched arabinans, and also contained small amounts of xyloglucans (XG), arabinogalactans type II (AGII), galactans, rhamnogalacturonans (RG) and xylogalacturonans (XGA). Xylans, cellulose, XG, arabinans and small amounts of RG composed beans hulls cell wall. The HTC seeds have less amounts of CDTA and water-soluble polysaccharides (FCDTA and FSA) and higher amounts of water insoluble material (FIA), especially polysaccharides of H4 fraction. Normal beans lose high amounts of pectic material during cooking by water soluble pectin depolymerization and solubilization, and mainly by H4 fraction polysaccharide solubilization. However, the loss of pectic material in HTC beans is minimal. Aged beans pectins could have less methylesterification degree and, therefore, less depolymerization. The loss in H4 fractions polymers solubility could be related with the loss of arabinans and XG branches, resulting in a straight polysaccharide backbone, that cause chains alignment and H bonds formation, produce less soluble structures. The increase in the amounts of XGA and UA in FSA and also in the FCDTA and FBF fractions corroborates the supposition.

1 INTRODUÇÃO

Os grãos (sementes maduras e secas utilizadas para alimentação), são considerados produtos duráveis devido ao baixo conteúdo de água (CHITARRA & CHITARRA, 1990). As sementes são estruturas altamente desidratadas que possuem reduzida atividade metabólica quando comparadas aos frutos e hortaliças frescas. Todavia, também estão sujeitas à deterioração durante a estocagem (ZHANG *et al.*, 1995).

A necessidade de aumentar a vida de prateleira dos produtos e agregar-lhes maior valor comercial tornou o estudo das alterações bioquímicas pós-colheita muito importante. É necessário evitar processos deteriorativos decorrentes do transporte e armazenamento dos produtos destinados à exportação e ao consumo interno. Além disso, a parcela mais carente da população mundial está concentrada nas regiões tropicais cujas colheitas, submetidas a temperatura e umidade elevadas, estão mais sujeitas ao ataque de predadores e à rápida deterioração durante a estocagem. Em países em desenvolvimento, onde a fome e a desnutrição estão presentes, os estudos que visam minimizar perdas e conservar a qualidade dos alimentos são de vital importância.

Um exemplo de deterioração que ocorre durante a estocagem é o defeito textural conhecido como *hard-to-cook* (HTC) que afeta o feijão e as demais leguminosas utilizadas na alimentação. O HTC se desenvolve quando as sementes são armazenadas por um período extenso sob condições de temperatura e umidade elevadas. O seu desenvolvimento é caracterizado pelo escurecimento do tegumento e por tornar as sementes resistente ao amaciamento por cocção. O longo período de processamento necessário para que estas sementes se tornem palatáveis provoca a perda de nutrientes e o desperdício de combustível, resultando em um produto de baixa palatabilidade (JONES & BOULTER, 1983; BHATTY, 1990; BRESSANI, 1982; LIU, 1995). Grãos macios e de coloração clara, que propiciam preparo rápido e produção de caldo espesso são apreciadas pelos consumidores. Devido a isso, produtores e comerciantes mostram grande interesse em adquirir sementes que exibam estas qualidades (BRESSANI, 1993).

Embora a estocagem sob refrigeração conserve a qualidade do produto por longos períodos, acaba resultando em um custo adicional de conservação que é considerado inaceitável. Neste caso seria mais adequado utilizar os recursos da

bioquímica para desvendar os mecanismos que levam ao HTC, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos cultivares menos propensos a adquirir este defeito textural. Para atingir esta meta, faz-se necessário adquirir conhecimentos a cerca da estrutura da parede celular e da lamela média que são as principais responsáveis pela texturados alimentos de origem vegetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características agronômicas da cultivar Carioca-Pérola.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é membro da família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subfamília Papilionoideae e originou-se no Novo Mundo, espalhando-se, posteriormente, por todos os continentes. É uma fonte de alimento importante para a população mundial e, também, a leguminosa mais consumida nos países em desenvolvimento (BREISSANI, 1993; REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993).

No Brasil são produzidos anualmente cerca de 3 milhões de toneladas de feijão. Entretanto, a produção nacional ainda é insuficiente para suprir plenamente o mercado interno, havendo necessidade de importação do produto. Devido à sua importância, a cultura do feijoeiro tem recebido muita atenção, sendo submetida ao aprimoramento genético com a finalidade de obter plantas resistentes, produtivas e com boas características de mercado.

O feijão Carioca-Pérola, desenvolvido pela EMBRAPA Arroz e Feijão, trata-se de uma cultivar nova e que tem demonstrado características satisfatórias, constituindo-se num material de estudo de grande interessante. Esta cultivar é caracterizada pela alta produtividade e resistência a diversas doenças. A planta, cuja floração se dá em 46 dias e colheita em 90 dias, é resistente à ferrugem, ao mosaico comum e a uma raça de antracnose. Sua resistência à murcha do fusarium e à mancha angular é intermediária, porém não chega a comprometer a produção que fornece 3.000 Kg/ha com irrigação (número superado por alguns produtores) e, em condições de sequeiro, 2.400 Kg/ha. Sua produtividade é 15 a 20% superior que a obtida pela variedade Carioquinha e seus grãos, maiores e de coloração mais clara, rendem preços até 10% superiores nos principais mercados atacadistas e consumidores (YOKOYAMA *et al.*, 1999).

O feijão Pérola originou-se da seleção de linhas puras da cultivar Aporé e foi lançado em outubro de 1996, sendo recomendado para os Estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Bahia e Distrito Federal. Recomendação esta, que foi estendida posteriormente para os Estados do Acre, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Norte, Rondônia e Santa Catarina (YOKOYAMA *et al.*, 1999).

Semeada em larga escala, o impacto da cultivar foi avaliado por Yokoyama *et al.*, (1999) que observaram a boa aceitabilidade e alta produtividade em relação a outras cultivares. Notaram, porém, que o seu tegumento escurecia com rapidez, sendo esta sua principal característica desfavorável. Visto que o desenvolvimento do HTC vêm acompanhado pelo escurecimento do tegumento (STANLEY & AGUILERA, 1985; REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993), a decisão de adotar a cultivar como objeto de estudo foi reforçada.

2.2 Qualidade nutricional do feijão HTC

O feijão e as demais leguminosas utilizadas na alimentação são ricos em carboidratos complexos (amido e fibra alimentar), ácidos graxos poliinsaturados (linolênico e linoléico), proteína, vitaminas do complexo B e sais minerais como Ca, Fe, Cu, Zn, P, K e Mg (PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 1989).

Suas características indesejáveis incluem a presença de fatores de flatulência, fitatos, lectinas, alergênicos, inibidores de protease e de α -amilase (BRESSANI, 1993, LAURENA *et al.*, 1994). A maioria destes compostos são eliminados durante o processamento, portanto, não são considerados como um fator limitante para o seu consumo. A exemplo disso, Khalil e Mansour (1995) puderam verificar que em favas o processamento térmico eliminava significativamente o conteúdo de estaquiose, tanino e vicina, reduzindo, também, a atividade do inibidor de tripsina e de hemaglutinina.

Embora o processamento elimine grande parte dos antinutrientes, um tratamento térmico prolongado, imprescindível em sementes HTC para que se tornem palatáveis, leva à perda de nutrientes. Bressani (1982) demonstrou que o processamento térmico excessivo causa perda da qualidade da proteína, principalmente da lisina que se torna indisponível devido ao seu comprometimento na reação de Maillard. O problema toma proporções maiores quando se considera

que os feijões HTC já apresentam baixa disponibilidade de seus nutrientes (REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993, SABARENSE *et al.*, 1995).

A literatura demonstra que o desenvolvimento do HTC causa decréscimo na qualidade e na digestibilidade das proteínas da semente (BRESSANI, 1982; SABARENSE *et al.*, 1995). Aguilera e Rivera (1992) observaram que, mesmo após a inativação dos fatores antinutricionais por tratamento hidrotérmico, a digestibilidade dos feijões HTC continuava baixa quando comparada aos feijões controle. Sabarense *et al.* (1995) também verificaram a baixa digestibilidade e menor biodisponibilidade das proteína de feijões HTC. Martin-Cabrejas *et al.* (1995), por sua vez, notaram que a solubilidade das proteínas era menor em feijões duros e sugeriram que o desenvolvimento do HTC causava lignificação da proteína, reduzindo dessa forma a sua solubilidade e digestibilidade. Estudaram, a quantidade de inibidores de tripsina e quimotripsina em sementes defectivas, não constatando, porém, qualquer alteração em suas quantidades. Notaram, entretanto, a redução no conteúdo de inibidores de α -amilase e aumento concomitante no de lectinas.

A digestibilidade do amido também parece sofrer prejuízos com o envelhecimento. Garcia e Lajolo (1994) verificaram que feijões endurecidos apresentavam amido com maior grau de cristalinidade e menos susceptível ao ataque enzimático, sendo, conseqüentemente, menos digeríveis. Como pode ser verificado, a digestibilidade dos nutrientes de sementes HTC é muito menor, quando comparada às sementes normais.

2.3 Diferenças entre *hard-to-cook* (HTC) e *hard-shell* (HS)

Como o próprio nome diz, o HTC está relacionado à qualidade de cocção das sementes e não ao seu estado físico. Desta forma, deve ser feita uma diferenciação entre feijões “duros” ou “endurecidos”, *hard-shell* (HS) e feijões HTC.

A dureza do grão é um estado físico apresentado pela semente. Variações na textura de sementes que acabaram de ser colhidas são atribuídas a fatores ambientais e genéticos (SHEHATA, 1992). O *hard-shell* (HS), por sua vez, está relacionado a um estado físico da planta que apresenta dificuldade em se embeber devido à impermeabilidade de suas cascas (ROLSTON, 1978; RODRIGUEZ e MENDOZA, 1990; CASTELLANOS *et al.*, 1995). Segundo Castellanos *et al.* (1995), é resultado da

adaptação das sementes a climas semi-áridos, sendo considerado próprio das plantas provenientes destas áreas. Por provocar embebecimento insuficiente, as sementes HS necessitam de maior tempo de cocção para que o amaciamento ocorra. Neste caso, a remoção da casca seria suficiente para que os cotilédones se embebessem adequadamente, eliminando-se o problema. O HS é um fenômeno que ocorre, principalmente, nos países de latitude norte, onde as sementes são estocadas nos armazéns aquecidos e sob condições de baixa umidade.

No caso do HTC, o seu desenvolvimento é acelerado quando as sementes são submetidas à temperatura e umidade elevadas durante a estocagem. Assim, é o principal problema textural que acomete os grãos de leguminosas nas regiões tropicais, a exemplo, o Brasil e boa parte dos países da América Latina, África e Ásia. Os feijões HTC em estado embebido e cru não se mostram mais duros do que os feijões normais (SEFA-DEDEH *et al.*, 1979). Entretanto, após um tempo determinado de cocção, os feijões normais amaciam-se e os HTC permanecem com textura dura e arenosa (GARRUTI & BOURNE, 1985). Segundo LIU (1995), o HTC é um defeito textural que torna a semente resistente ao amaciamento por cocção é só é confirmado após o preparo, quando estas falham em amaciar sob tratamento hidrotérmico. Também deve ser ressaltado que o HTC, ao contrário do HS, não é resolvido com o descascamento, pois resulta de mudanças biológicas ocorridas no cotilédone da semente (HINCKS & STANLEY, 1986; LIU, 1995). Além disso, estudos demonstram que feijões HTC absorvem menos água durante a maceração, mesmo na ausência das cascas (DELVALLE *et al.*, 1992). Por exemplo, Plhak *et al.* (1989) verificaram que feijões HTC retém cerca de 25% menos água do que os feijões normais. Além disso, também foi verificado que amostras endurecidas apresentam perda de estruturas citoplasmáticas e autólise parcial dos corpos protéicos (VARRIANO-MARSTON & JACKSON, 1981; BEGNAMI & CORTELAZZO, 1996).

2.4 Importância da textura

Segundo Wilkinson *et al.* (2000), a palatabilidade de um alimento é essencialmente determinada pela percepção sensorial causada pelo produto. Esta percepção influi sobremaneira no comportamento de compra dos consumidores, pois os alimentos que produzem sensações agradáveis são preferidos e adquiridos com

maior frequência, aumentando o seu valor de mercado. Portanto, não é de se admirar que as companhias que detém a capacidade de manipular ativamente e controlar as propriedades sensoriais dos alimentos possuam vantagem competitiva sobre as demais. Isto só é possível quando há entendimento perfeito da relação entre a estrutura do alimento e as propriedades sensoriais.

De acordo com Bourne (1980), a percepção de um alimento é responsável pela sua aceitabilidade e pode ser dividida em 3 categorias: **(a)** aparência (cor e forma), baseada nas propriedades ópticas; **(b)** *flavor* (sabor e odor) que é a resposta dos receptores na cavidade oral, desencadeada pelo estímulo químico; **(c)** toque, que é a resposta das sensações táteis ao estímulo físico e que resulta do contato do alimento com algumas partes do corpo.

A sensação do toque é comumente chamada de textura, ou melhor, propriedade textural. Segundo Bourne (1980), é um atributo de qualidade importante nas hortaliças, cujo valor deve igualar-se ao da aparência e do *flavor*. O autor define a textura como sendo o grupo de características físicas sentidas pelo tato, relacionado com a deformação, desintegração e fluidez do alimento sob uma força aplicada e que pode ser medido objetivamente em função da força, tempo e distância.

A textura nos alimentos de origem vegetal é o resultado de um conjunto de fatores e propriedades que incluem característica mecânicas (dureza, viscosidade e elasticidade), geométricas (forma, tamanho de partícula) e químicas (umidade e conteúdo de lípidos). De acordo com Jackman e Stanley (1995) a textura está principalmente relacionada com a integridade da parede celular e lamela média e com a pressão de turgor que é gerada dentro da célula devido à osmose. A pressão de turgor é a pressão hidrostática presente nas células vivas, gerada pela habilidade das mesmas em absorverem água. Esta pressão força os vacúolos em direção à parede celular e pode alcançar valores superiores a 200 libras por polegada quadrada, (BOURNE, 1983).

A textura é o principal atributo de qualidade dos grãos e influenciar sobremaneira a aceitação do produto pelo consumidor (BRESSANI, 1993). Durante o processo de colheita, transporte e armazenamento inúmeras alterações ocorrem provocando alterações no sabor, cor e textura dos alimentos. Nos feijões, o

escurecimento da casca e os defeitos texturais causados pelo armazenamento inadequado são considerados muitos depreciativos (Figura 1).

Figura 1: Alteração na coloração da casca de feijões c.v. IAC Carioca, observada após o armazenamento a 30°C / 75%UR durante períodos de 3, 6 e 9 meses.

A deterioração gradual na qualidade textural dos grãos é um problema de difícil solução, cujo mecanismo exato ainda não está bem estabelecido. No presente momento, as alterações na estrutura da parede celular são cogitadas como sendo a principal responsável pelo processo.

2.4.1 Fatores que influenciam a textura.

Os tecidos vegetais compostos por células parenquimatosas são os que apresentam maior importância na alimentação humana e são consumidos não somente devido aos nutrientes neles depositados mas por possuírem uma textura que permite a pronta liberação de seus componentes celulares através de sua ruptura mecânica ou química.

As células maduras de parênquima são estruturas isodiamétricas e poliédricas, que medem de 50 a 500 µm de diâmetro sendo e, em alguns casos especiais, são bem maiores (BOURNE, 1983). Seu interior é preenchido por citoplasma, núcleo e, geralmente, por um único vacúolo que ocupa a maior parte da célula. O tamanho e o formato das células bem como o seu conteúdo influenciam na textura final do alimento.

A célula vegetal é envolvida pela parede primária, que é uma estrutura fina (0,1-10 µm) mas suficientemente forte para suportar a pressão de turgescência (0.3 a 1 MPa) e limitar a expansão causada pelos fluidos intracelulares, (JACKMAN & STANLEY,

1995). Esta estrutura, capaz de suportar uma tensão entre 100 a 250 mPa, evita o rompimento da célula. Dependendo do tecido e grau de maturidade da célula, também se observa a presença da parede celular secundária que proporciona maior rigidez e resistência mecânica aos tecidos.

As células encontram-se unidas umas às outras através da lamela média. A lamela média é formada em sua maioria por substâncias pécticas e é responsável pela coesão entre as células, garantindo desta forma a integridade dos tecidos vegetais. A espessura e composição da parede celular e da lamela média influenciam muito a textura dos alimentos (JACKMAN & STANLEY, 1995). A união entre as células produz espaços intercelulares que podem estar preenchidos por ar, CO₂ ou vapor d'água, que também podem contribuir com a textura final dos alimentos (JACKMAN & STANLEY, 1995).

A estrutura da célula e da parede celular é muito importante na textura de alimentos. A textura é determinada, principalmente, pela forma com que a parede celular se deforma e rompe sob a pressão da mastigação (WALDRON *et al.*, 1997). Depende de uma hierarquia de fatores estruturais. Em primeira instância, do órgão do qual provém o alimento. Em segunda instância, está subordinada aos tecidos que compõem este órgão. As células e os espaços intercelulares formam o próximo nível estrutural. Por último, depende da parede celular e da lamela média. As propriedades mecânicas da parede celular e da lamela média são influenciadas, principalmente, pelos polissacarídeos que os formam e que representam o nível estrutural mais básico (ILKER & SZCZESNIAK, 1990)

As propriedades mecânicas dos tecidos vegetais dependem, portanto, da contribuição dos diferentes níveis estruturais e de como cada componente interage química e fisicamente sob a ação desintegradora das forças aplicadas durante o processo de mastigação. Por exemplo, texturas crocantes são caracterizadas pela presença de células fortemente aderidas umas a outras, que se partem ao longo no momento da mastigação. Este tipo de textura é característico de algumas frutas e de legumes crus, onde as células se encontram fortemente aderidas pela lamela média (ILKER & SZCZESNIAK, 1990; BRETT & WALDRON, 1996). Texturas macias e secas são produzidas quando as células encontram-se fracamente aderidas. Neste caso, as

células separam-se sem que haja o rompimento das mesmas. Batata e feijão cozidos apresentam este tipo de textura (BOURNE, 1983; WALDRON *et al.*, 1997).

2.4.2 Desestruturação dos polímeros da parede celular e sua relação com a textura.

Em frutos, enzimas como a endopoligalacturonase (EPG), celulase, β -galactosidase e pectinometilesterase (PME) atuam na modificação da textura, promovendo a despolimerização e solubilização de seus substratos. Desta forma, o amaciamento e adoçamento dos frutos está, em grande parte, relacionado à ação de enzimas despolimerizadoras (BOURNE, 1983; JACKMAN & STANLEY, 1995; ILKER & SZCZESNIAK, 1990). Entretanto, o amaciamento dos tecidos conseguido através do processamento térmico é decorre de outros fatores. Em feijão, o abrandamento se dá através da gelatinização do amido, desnaturação das proteínas e despolimerização dos polissacarídeos da parede celular e da lamela média por mecanismo de eliminação em β (SEFA-DEDEH *et al.*, 1978; LIU, 1995).

Na reação de β -eliminação, o átomo de H em 5 encontra-se ativado, sendo facilmente removido por um nucleófilo, no caso, pelos íons hidroxila (Figura 2). O carbânion intermediário, formado pela remoção do H-5 pelos íons hidroxila, é estabilizado pela eliminação no C-4. Como pré-requisito é necessário a presença de grupos metil éster eletronegativos no C-6, que tornam o H-5 suficientemente ácido para que a reação ocorra. A reação de β -eliminação se processa sob pH ligeiramente ácido ou básico, não ocorrendo quando a acidez do meio é maior (KEJBETS & PILNIK, 1974).

Com a desmetilação das pectinas pela ação da PME, a reação de β -eliminação seria evitada. Assim, os polissacarídeos pécticos não sofreriam despolimerização e a criação de novos grupos carregados negativamente ($-\text{COO}^-$), contribuiriam para a formação de pectatos insolúveis sob presença de íons bivalentes. De acordo com a literatura, a formação de pectato de Ca^{2+} insolúvel impede a dissolução da lamela média durante o processo de cocção, causando o enrijecimento dos tecidos vegetais (JACKMAN & STANLEY, 1995).

Figura 2: Reação de β -eliminação observado na degradação de pectinas durante o processamento hidrotérmico de vegetais (KEJBETS & PILNIK, 1995).

Conclui-se, portanto, que os polissacarídeos da parede celular e da lamela média são os principais responsáveis pela textura dos alimentos de origem vegetal. Pequenas diferenças em sua química, mudam drasticamente a textura dos alimentos, o que justifica a existência de inúmeros trabalhos que consideram o HTC como um defeito textural que resulta de alterações na estrutura polissacarídica (HINCKS & STANLEY, 1986; LIU, 1995).

2.5 Estrutura dos Carboidratos

Os açúcares apresentam a fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$, motivo pelo qual são denominados carboidratos ou hidratos de carbono. São poliidroxiáldeídos ou poliidroxicetonas que se diferenciam de acordo com sua fórmula química, configuração e conformação química (MARZZOCO & TORRES, 1999). A classificação destes compostos pode ser dada pelo número de carbonos. Por exemplo, a triose tem três carbonos, a tetrose quatro, a pentose cinco a hexose seis átomos, e assim por diante (MARZZOCO & TORRES, 1999; VOET *et al.* 1998). Os monossacarídeos podem apresentar isomeria de grupo funcional, por exemplo, ceto hexose e aldo hexose, ou estereoisomeria quando o arranjo de seus átomos no espaço difere de uma molécula

para outra. Quando os açúcares diferem apenas pela configuração em torno de um átomo de C são denominados epímeros uns dos outros. A glicose e a manose são epímeros em relação ao C-2 (VOET *et al.* 1998).

Em solução, as cadeias carbônicas contendo cinco a seis átomos de carbonos podem rearranjar-se, formando anéis de cinco e seis membros (CARPITA & MCCANN, 2000). Os anéis de seis membros são denominados piranoses (*p*) e de cinco membros, furanoses (*f*). Quando ocorre a ciclização, o carbono da carbonila, denominado carbono anomérico, cria um novo carbono quiral em C-1, originando duas formas cíclicas que são diastereômeros, ou seja, diferem somente pela configuração do C-1. Assim, compõem duas conformações anoméricas: α onde a hidroxila ligada ao C-1 situa-se em posição axial ao plano do anel e β , equatorial ao plano do anel (VOET *et al.* 1998).

Os monossacarídeos podem formar compostos maiores e mais complexos como oligo e polissacarídeos, glicolípides e glicoproteínas. Os oligossacarídeos são carboidratos formados pela união de pequeno número de monossacarídeos através de ligações glicosídicas. A ligação glicosídica é formada pela união de dois monossacarídeos através das hidroxilas livres com perda de uma molécula de água. Os polissacarídeos são formados pela união de centenas ou milhares de monossacarídeos (VOET *et al.* 1998).

A extremidade do polímero que apresenta monossacarídeo com C-1 livre é denominada extremidade redutora em oposição à outra, não-redutora. Em solução aquosa estas formas podem sofrer mutarotação, contudo, permanecem fixas na posição quando o carbono anomérico liga-se a outra molécula. Além disso, quando os monossacarídeos estão ciclizados, podem adotar duas outras conformações espaciais: a forma de barco e de cadeira. Podem apresentar, também, configuração D e L, de acordo com a posição dos grupos hidroxila no carbono assimétrico (quiral) mais afastado do C-1. Um polissacarídeo é descrito de acordo com o tipo de ligação e pela sua configuração anomérica (CARPITA & MCCANN, 2000).

Como podemos ver, elucidar a estrutura dos polissacarídeos é um trabalho árduo, pois requer o conhecimento da sequência dos açúcares, das extremidades redutoras, do tipo e número de ligações glicosídicas e da sua conformação

anomérica. Além disso, é difícil quantificar e qualificar carboidratos simples e complexos, visto que estes compostos não absorvem luz no UV ou visível nem apresentam fluorescência, absorvendo apenas no UV distante (190-200nm). Para dificultar mais a tarefa, estes compostos não são voláteis, pois possuem grupamentos hidroxila altamente polares. Para a análise de seus compostos por CG a realização da derivatização é necessária para transformá-los em compostos voláteis à temperatura de análise. Recentemente a análise de carboidratos por HPLC foi melhorada com o desenvolvimento do detector de pulso amperométrico (PAD), de espalhamento de luz por nebulização (ELSD) e com a produção de colunas mais apropriadas. Entretanto, deve ser levado em consideração que os métodos de detecção citados não são seletivos e também respondem à outras substâncias, por exemplo, proteína.

2.6 A arquitetura da parede celular.

Dois tipos de parede celular foram descritos minuciosamente por Carpita e Gibeaut (1993). A parede celular presente em monocotiledôneas não-comelinóides e na maioria das dicotiledôneas (parede celular tipo I) e a de monocotiledôneas comelinóides (parede celular tipo II). Devido ao fato do feijão se tratar de uma dicotiledônea com parede celular tipo I, somente este tipo será abordado.

A parede celular de vegetais é composta por macromoléculas, a maior parte, polissacarídeos altamente complexos, proteínas estruturais, compostos fenólicos e enzimas. Os componentes poliméricos coexistem formando uma rede intrincada, porém dinâmica (CARPITA & GIBEAUT, 1993; CARPITA & MCCANN, 2000), estabilizada por diversas ligações químicas (FRY, 1980; FRY, 1983; BRADY *et al.*, 1998, ISHII, 1997).

Vários trabalhos e revisões descrevem meticulosamente a estrutura da parede celular de vegetais e de seus principais constituintes polissacarídicos (CARPITA & GIBEAUT, 1993; COSGROVE, 1997; RIDLEY *et al.*, 2001; CARPITA & MCCANN, 2000, BRETT & WALDRON, 1996 e BACIC *et al.* 1988). A extração e a purificação dos polímeros de parede celular também foram abordadas detalhadamente por Selvendran & O'Neil, (1987), York *et al.* (1986) entre outros.

2.6.1 Celulose e Hemicelulose.

Em dicotiledôneas e em monocotiledôneas não-comelinóides, a parede celular é composta por uma estrutura cristalina formada por microfibrilas de celulose, envolta por hemicelulose. Esta estrutura microfibrilar encontra-se mergulhada em uma matriz de polissacarídeos pécticos com característica de gel. A quantidade de cada componente pode variar de uma célula para outra, de acordo com o grau de maturidade e tipo de célula (CARPITA & GIBEAUT, 1993; BRETT & WALDRON, 1996).

A celulose é composta por várias cadeias lineares de D-glicose (Glc) unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ estabilizadas por pontes de hidrogênio que formam microfibrilas paracristalinas (Figura 3). Esta estrutura interage com a hemicelulose através de pontes de hidrogênio, compondo o primeiro domínio da parede celular.

Figura 3: Estrutura da celulose (A) e do xiloglicano; fragmento XXXG (B) e XXLG (C) e XXFG (D), mostrando diferentes tipos de ligação, estrutura de cadeia e ramificação.

A hemicelulose encontrada em maior quantidade em dicotiledôneas e monocotiledôneas não-comelinóides é o xiloglicano. Este heteropolímero ramificado é composto por uma cadeia principal de D-glicose β 1,4-ligada contendo ramificações de D-xilose α 1,6-ligada à glicose. Alguns resíduos de xilose podem apresentar-se substituídos com o dissacarídeo α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 2) e, ocasionalmente, com Ara (1,2-ligada) (Figura 3). A galactose (Gal) também pode vir acetilada no C-4 e no C-3 da molécula (CARPITA & GIBEAUT, 1993; CARPITA & MCCANN, 2000).

Os xiloglicanos são compostos por blocos contendo de 6 a 11 resíduos de açúcar que se repetem na molécula. Essas estruturas fundamentais são formadas por quantidades equimolares de XXXG e XXFG (segundo a nomenclatura utilizada por FRY *et al.*, 1983), podendo ocorrer, também, algumas variações em sua estrutura (Figura 3).

2.6.2 Polissacarídeos pécticos.

O segundo domínio é formado por polissacarídeos pécticos heterogêneos, ricos em ácido D-galacturônico (AGal), que também podem conter açúcares neutros. Estes polímeros são solúveis em água e em soluções contendo agentes quelantes como CDTA ou EDTA e estão presentes em grande quantidade na lamela média.

Os principais polissacarídeos ácidos encontrados em dicotiledôneas são os homogalacturonanos (HGA) e os ramnogalacturonanos tipo I (RGI). Quantidades menores de ramnogalacturonanos tipo II (RGII) também podem ser encontrados (Figura 4).

O RGI é um heteropolissacarídeo formado por unidades repetitivas de (1 $\rightarrow$ 2) α -L-Ram-(1 $\rightarrow$ 4) α -D-AGal, onde cerca de metade dos resíduos de ramnose (Ram) encontram-se ligados a cadeias laterais através do carbono 4 (C-4). O Comprimento desta molécula é desconhecido devido à presença de regiões formadas por HGA(s) nas extremidades da molécula. Os HGA(s) são homopolímeros compostos por unidades repetitivas de (1 $\rightarrow$ 4) α -D-AGal (Figura 3). Os RGII, compostos por uma diversidade de açúcares, estão presentes em pequenas quantidades e, portanto, não são considerados como moléculas estruturais (CARPITA & GIBEAUT, 1993; CARPITA & MCCANN, 2000). Outro tipo de galacturonano

forma livre ou ligados à estrutura dos RGI através do C-4 da L-ramnose. (Figura 4). Os galactanos são polímeros compostos por galactose β 1,4-ligada. Os AGI também são formados por uma cadeia principal de D-galactose β 1,4-ligada, porém, contém ramificações de arabinose terminal (*t-araf*) ligadas ao carbono 3 da galactose. Outro grupo, os arabinogalactanos tipo II (AGII) também podem ser encontrados. Sua estrutura é formada por cadeias curtas de (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) β -D-galactanos, com a maioria dos oxigênios dos carbonos 3 e 6 substituídos por unidades *t*-arabinosil (Figura 4).

Os arabinanos são polissacarídeos altamente ramificados formados por uma cadeia principal constituída por L-arabinose α 1,5-ligada contendo cadeias laterais com um único resíduo de L-arabinose unidas à cadeia principal por ligações α (1-2) ou α (1-3) (BRETT & WALDRON, 1996; CARPITA & GIBEAUT, 1993).

2.6.3 Proteína e compostos fenólicos

Apesar de ser composta em sua maioria por polissacarídeos, a parede celular também possui proteínas estruturais, compostos fenólicos e enzimas.

Existem pelo menos 4 classes principais de proteínas estruturais: Extensinas, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGP), as proteínas ricas em prolina (PRP) e as lectinas de solanáceas (SOMMER-KNUDSEN, 1998). Suas quantidades variam de acordo com o tecido e espécie. As revisões feitas por Showalter (1993) e Sommer-Knudsen, (1998) abordam com detalhes a estrutura e a função das proteínas de parede celular.

A classe de proteína estrutural mais estudada é a extensina, que é uma família de HRP(s) que está ausente na lamela média mas encontra-se distribuída uniformemente pela parede celular primária. Em dicotiledôneas, estas proteínas são particularmente abundantes e caracterizadas por possuir quantidade elevada de hidroxiprolina e serina, normalmente em unidades repetitivas de Ser-(Hyp)₄ e Tyr-Lys-Tyr. A extensina é altamente glicosilada (50-60%, p/p), contendo ramificações formadas por 1 a 4 resíduos de arabinose (Ara₁₋₄). Esta proteína interage com os polissacarídeos através de ligações iônicas e covalentes, formando ligações cruzadas

inter e intramoleculares (CARPITA & GIBEAUT, 1993; SHOWALTER, 1993; SOMMER-KNUDSEN, 1998; CARPITA & MCCANN, 2000).

Os compostos fenólicos são encontrados na parede celular na forma de lignina, um polímero fenólico formado por subunidades de *p*-coumaril, guaiacil e sinapilpropano. Estes precursores produzem um polímero de padrão irregular devido à natureza não enzimática da polimerização, compondo uma rede hidrofóbica. Esta estrutura aparece, principalmente, quando há a formação da parede celular secundária (BRETT & WALDRON, 1996).

Os compostos fenólicos também são encontrados na parede celular não lignificada. O ácido ferúlico, por exemplo, pode estar esterificado à arabinose e à galactose de pectinas (MCNEIL *et al.*, 1984). Duas moléculas de ácido ferúlico podem reagir formando dímeros, compondo ligações cruzadas inter ou intramoleculares.

Muitos trabalhos associam a polimerização destes compostos como a principal causa do enrijecimento dos tecidos em sementes HTC (VARRIANO-MARSTON & JACKSON, 1981; HINCKS & STANLEY, 1987; MAFULEKA *et al.*, 1993). Entretanto, a formação de pectatos de cálcio continua sendo considerada como a causa principal do fenômeno (MATTSON, 1946; SEFA-DEDEH *et al.*, 1978; JONES & BOULTER, 1983; SHOMER *et al.* 1990, AGUILERA & RIVERA, 1992).

2.6.4 Ligações cruzadas.

As ligações químicas que estabilizam os polímeros da parede celular podem ser divididas em covalentes e não-covalentes. Estas, por sua vez, podem ocorrer de forma inter e intramoleculares. As principais ligações químicas presentes na parede celular de vegetais são as pontes de cálcio, as ligações covalentes (éster e éter) formadas pelos ácidos fenólicos e proteínas aromáticas e as interações fracas do tipo ponte de hidrogênio que formam interações entre as macromoléculas de celulose e entre a celulose e os xiloglicanos.

Na Figura 5 podemos ver os produtos da coordenação do cátion Ca^{2+} com as carboxilas livres dos ácidos galacturônicos presentes na estrutura dos HG(s). Nas paredes celulares de dicotiledôneas e monocotiledôneas não-comelinóides, as pectinas são polímeros predominantemente aniônicos e acredita-se que muitas das suas

propriedades são determinadas pelas interações eletrostáticas com íons Ca^{2+} resultando na formação de géis (RIDLEY *et al.*, 2001).

Figura 5: Estrutura formada pela coordenação dos cátions Ca^{2+} com os grupamentos $-\text{COO}^-$ de homogalacturonanos compondo “zonas de junção” (A) e em forma de “caixa de ovos” (B). Cadeias paralelas e antiparalelas formadas por homogalacturonanos parcialmente metilados podem compor ligações cruzadas mais fracas (B). Extraído de CARPITA & MCCANN (2000).

A solubilização dos pectatos de Ca^{2+} é conseguida através do tratamento com soluções quelantes de CDTA, EDTA ou oxalato. De acordo com a revisão feita por Ridley *et al.* (2001), acredita-se que as pectinas solubilizadas com soluções quelantes são provenientes da lamela média e desempenham papel importante na adesão entre as células.

Dentre as ligações covalentes mais citadas e prováveis de ocorrerem na parede celular estão os dímeros de ácido ferúlico e a isoditrosina (Figura 6). O ácido ferúlico é encontrado em pectinas, esterificado à arabinose e à galactose (MCNEIL *et al.*, 1984), podendo formar ligações difenil através da ação da peroxidase (FRY, 1983; FRY, 1986; BRETT & WALDRON, 1996; ISHII, 1997) (Figura 6).

Figura 6: Ligações cruzadas em pectinas e proteínas estruturais. Formação de diferulato e de isoditirosina catalisada pela peroxidase. Extraído de BRETT & WALDRON (1996), com modificações.

Outro tipo de ligação covalente, também catalisada pela peroxidase, dá-se entre 2 resíduos de tirosina com a formação da isoditirosina (FRY, 1986; BRETT & WALDRON, 1996). Além das ligações envolvendo fenólicos, existem as pontes dissulfeto e outros tipos mais complexos envolvendo ligações formadas pela união de três resíduos de tirosina, produzindo trímeros (PERRONE *et al.*, 1998; BRADY *et al.*, 1998).

Em revisão, Ishii (1997) aborda as principais ligações cruzadas formadas pelos ácidos hidroxicinâmicos que se encontram esterificados nos polissacarídeos de parede celular. Alguns exemplos de ligações cruzadas presentes na parede celular de plantas estão apresentadas na Figura 7.

A solubilização dos polímeros da parede celular se dá através da quebra destas ligações. De acordo com a literatura, os polímeros que se encontram mais livres são solubilizados com água. Os polímeros ligados por pontes de cálcio são liberados com solução quelante de oxalato, EDTA ou CDTA. As ligações éster só são quebradas pelo uso de soluções alcalinas através de reação de saponificação. As hemiceluloses ligadas à celulose, serão liberadas somente com o uso de álcali forte. (SELVENDRAN & O'NEILL, 1987).

Figura 7: Representação dos vários tipos de ligações químicas presentes em plantas. Isoditrosina, formando ligações intrapeptídicas necessárias à estabilização das proteínas estruturais (a); Aminoácidos sulfurados e aromáticos formando ligações arílicas e éter com ácidos hidroxicínâmicos esterificados aos polissacarídeos (b); ligações cruzadas entre polissacarídeos vizinhos, formando ligações cruzadas diretamente com os açúcares (c). Extraído de CARPITA & MCCANN (2000).

A parede celular de feijão apresenta estrutura rica em pectinas fortemente ligadas, com quantidades apreciáveis de arabinose. Quantidades pequenas de xiloglicano foram encontradas em feijões, verificando-se, também, a presença de

xilogalacturonanos e xilanos (RYDEN & SELVENDRAN, 1990; GOONERATNE *et al.*, 1994^b; MCDUGALL & SELVENDRAN, 2001).

2.7 Mecanismos propostos para explicar o fenômeno HTC.

Entre as várias hipóteses levantadas para explicar o fenômeno hard-to-cook, destacam-se os mecanismos relacionados com alterações ocorridas nos polissacarídeos de parede celular, nos materiais de reserva (amido e proteína) e a teoria da lignificação envolvendo compostos fenólicos.

A principal dificuldade encontrada ao analisar estes trabalhos, é que não há uma metodologia padronizada para induzir o endurecimento das sementes, tornando difícil a comparação entre eles. Muitas vezes, os resultados são contraditórios, dificultando ainda mais a interpretação dos resultados. As poucas revisões encontradas sobre o assunto (AGUILERA & STANLEY, 1985; STANLEY & AGUILERA, 1985; HINCKS & STANLEY, 1986; SHEHATA, 1992; REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993; LIU, 1995), mostram que o fenômeno HTC é extremamente complexo, envolvendo diferentes mecanismos de ação o que justifica, em parte, os resultados ambíguos encontrados na literatura.

2.7.1 Complexo pectina-cátion-fitato.

De acordo com a literatura, o HTC está relacionado com a dificuldade de separação das células do cotilédono mediante cocção (SEFA-DEDEH *et al.*, 1978; JONES & BOULTER, 1983; NARASIMHA *et al.*, 1989; SHOMER *et al.*, 1990). Aparentemente, esta forte coesão das células deve-se à menor solubilidade dos polímeros da lamela média em feijões HTC. Inúmeras são as teorias que relacionam o endurecimento com alterações ocorridas na parede celular e lamela média envolvendo os polissacarídeos de parede celular (MATTSON, 1946; SEFA-DEDEH *et al.*, 1978; JONES & BOULTER, 1983; SHOMER *et al.* 1990, AGUILERA & RIVERA, 1992). Mecanismos semelhantes à lignificação também foram relacionados com o HTC (VARRIANO-MARSTON & JACKSON, 1981; HINCKS & STANLEY, 1987; MAFULEKA *et al.*, 1993). Entretanto, a natureza exata dos fenômenos envolvidos ainda é desconhecida.

A principal teoria que relaciona os polissacarídeos de parede celular com o endurecimento, enfatiza a formação de complexos entre a pectina e os cátions bivalentes. Esta teoria foi baseada no trabalho de Mattson (1946) com ervilhas amarelas sendo consolidada posteriormente com os estudos de Jones e Boulter (1983). A teoria relaciona a propriedade que as pectinas possuem de ligar-se aos íons Ca^{2+} através de seus grupos carboxíla livres, formando pectatos de cálcio insolúveis. Segundo Mattson (1946), durante o processo de maceração e cocção, o fitato presente nas células se difunde para a lamela média, quelando os cátions bivalentes e solubilizando as pectinas. Entretanto, em sementes HTC a ativação da fitase provocaria redução da quantidade de fitato e causando a liberação de cátions bivalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) que, ao passar para o espaço intercelular, formariam complexos insolúveis com as pectinas.

Posteriormente, Jones e Boulter (1983) e Shomer *et al.* (1990) comprovaram, através de microscopia, que a separação entre as células do cotilédone de feijões HTC era menor do que a observada em feijões normais após o cozimento, indicando que a integridade da lamela média não havia sido comprometida pelo tratamento hidrotérmico. De acordo com Jones e Boulter (1983) a desesterificação das pectinas, promovida pela ação da pectinometilesterase (PME), provocaria aumento do número de carboxilas livres, favorecendo ainda mais a formação de pectatos insolúveis. O mesmo fenômeno foi levantado por Narasimha *et al.* (1989) em estudos utilizando guandu (*Cajanus cajan*) e por Plhak *et al.* (1989) em feijões pretos.

São vários os trabalhos que enfatizam a formação de complexos insolúveis envolvendo os polímeros da parede celular e lamela média. A formação dos complexos não só impediria a despolimerização das pectinas, como dificultaria a entrada de água nas células, restringindo a gelatinização do amido (LIU, 1995). Porém, Vindiola *et al.* (1986), descartaram essa idéia afirmando que após 15 min de cocção já haveria água suficiente no interior da célula para que ocorresse a gelatinização do amido e desnaturação das proteínas. De acordo com os autores, no cozimento, o conteúdo da célula não participaria do processo de amaciamento dos tecidos, que estaria relacionada somente com a dissolução da lamela média e separação das células. Os estudos de Moscoso *et al.* (1984) corroboram esta teoria ao afirmar que feijões macios apresentavam maior perda de material péctico para a água

de cozimento do que feijões endurecidos. Os mesmos autores, assim como Ockenden *et al.* (1997); Hernández-Uzón e Ortega-Delgado (1989) e Hentges *et al.* (1991), também observaram que o conteúdo de fitato presente em feijões duros é menor do que em feijões normais.

Mafuleka *et al.* (1993) também relacionaram a redução no conteúdo de fitato com o endurecimento de feijão. Entretanto, Bernal-Lugo *et al.* (1991) não verificaram a difusão do ácido fítico presente nas sementes para a água de cozimento, descartando sua ação como agente quelante. Varriano-Marston e Jackson (1981), também rejeitaram a hipótese de que a hidrólise dos fitatos era responsável pelo endurecimento e relacionaram o fenômeno a processos degradativos nas células. Liu (1995) sugeriu que a liberação de cálcio contribuiria duplamente com o fenômeno, pois ativaria a PME causando desesterificação das pectinas e, consequentemente, o aumento do número de carboxilas livres.

Kilmer *et al.* (1994), verificaram que feijões macerados em água à 25°C por 16h liberavam cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} e fosfato e que, em amostras envelhecidas, a quantidade de íons liberados era maior, neste caso, a adição de agentes quelantes reverteria o endurecimento. Em seu trabalho, adicionaram fluoreto de sódio às amostras de feijões endurecidos e verificaram que estas se tornavam macias. Entretanto, após a retirada de íons fluoreto, as amostras desenvolviam o HTC ao serem incubadas em tampão acetato de sódio pH 4,8 a 41°C. Em vista disso, inferiram que o íon fluoreto prevenia o endurecimento não somente através da formação de fluoretos de Ca^{2+} e Mg^{2+} insolúveis mas, também, devido à inibição competitiva da fitase com os íons fluoreto. Paredes-López *et al.* (1991) e Del Valle e Stanley (1995) também estudaram a ação de soluções quelantes na reversão do endurecimento e concluíram que a retirada dos cátions do meio favorecia o amaciamento das sementes.

Liu *et al.* (1992^a) verificaram que o tratamento com EDTA produzia bons resultados, revertendo totalmente o endurecimento em feijão caupi, ao passo que o EGTA promovia apenas reversão parcial. Dessa forma, sugeriram que o desenvolvimento do HTC em feijão caupi se dava através de dois estádios: primeiro, haveria aumento na capacidade de captação de cátions pelos cotilédones, induzido

pelo aquecimento moderado ou armazenamento sob condições adversas; segundo, ocorreria a ligação dos cátions. Aguilera e Rivera (1992) observaram que a reversão de endurecimento conseguida pela maceração de feijões endurecidos com EDTA era maior do que a produzida por Na_2HPO_4 e NaHCO_3 , entretanto, esta não era completa. Assim, dividiram o fenômeno HTC em duas partes, uma reversível pela maceração com EDTA e outra irreversível. Sugeriram que o processo de endurecimento estaria associado a um mecanismo reversível, ligado à formação de pontes de cálcio e a outro irreversível relacionado a acontecimentos desconhecidos. Del Valle e Stanley (1995) apoiaram esta teoria atribuindo a parte irreversível do fenômeno a reações envolvendo compostos fenólicos muito semelhantes à lignificação, dependentes da temperatura de armazenamento e vincularam a parte reversível à atividade de água. Posteriormente, a natureza complexa do fenômeno suscitou teorias envolvendo a ação de múltiplos mecanismos (HINCKS & STANLEY, 1986; LIU, 1995).

Embora muitos trabalhos atribuam à teoria pectina-cátion-fitado a responsabilidade pelo HTC, existem evidências de que outros fatores também estariam envolvidos. Um exemplo disso seria a digestão autofágica de corpos protéicos apresentada por feijões envelhecidos. Atribuir o HTC a um único mecanismo simplificaria demais o fenômeno, além disso, foram observadas discrepâncias nesta teoria. Por exemplo, Bernal-Lugo *et al.* (1990) verificaram que não havia relação entre a qualidade de cocção da semente e o conteúdo de fitato. Liu *et al.* (1992b) não observaram correlação entre a ação da PME, a desmetilação das pectinas e o grau de maciez em caupi. Além disso, a reversão do endurecimento causada por agentes quelantes não era total (AGUILERA & RIVERA, 1992), o que suscitou a hipótese de que o HTC também estaria relacionado com mecanismos envolvendo alterações nas reservas da semente, degradação das membranas celulares, participação dos compostos fenólicos em mecanismos semelhantes à lignificação e a ativação de várias enzimas (JONES & BOULTER, 1987; HINCKS & STANLEY, 1986; HINCKS & STANLEY, 1987; LIU, 1995)

2.7.2 O papel das membranas

Outra teoria importante relacionada com o endurecimento é a perda da integridade do plasmalema devido à ação dos radicais livres produzidos no processo de envelhecimento.

A integridade do plasmalema e demais membranas da célula é essencial para a atividade celular normal. Portanto, a perda de integridade das membranas implica em perda de viabilidade das sementes. Além disso, membranas danificadas permitem que as substâncias compartimentalizadas em seu interior escapem, facilitando o acesso das enzimas a seus substratos. A perda de seletividade das membranas também causa perda de pressão de turgor das células. Quando a membrana celular se encontra íntegra, permite a passagem de água para o interior da célula, impedindo a saída de moléculas grandes, tais como os açúcares Bourne (1983). Isto cria uma pressão hidrostática no interior das células vivas, denominada pressão de turgor. Essa pressão seria necessária para empurrar as células umas contra as outras, permitindo a sua separação, por exemplo, durante a cocção de sementes.

Varriano-Marston e Jackson (1981), observaram a desintegração de organelas e inclusões nas células de feijões HTC e associaram essa perda generalizada de integridade das membranas ao aumento nas reações de peroxidação. Esta perda de integridade das membranas também foi observada por Richardson e Stanley (1991) em feijões envelhecidos. As membranas danificadas perderiam a permeabilidade seletiva, causando a lixiviação dos solutos. Isto provocaria a perda de turgor, limitando a separação das células durante a cocção (VARRIANO-MARSTON & JACKSON, 1981; JONES & BOULTER, 1983; RICHARDSON & STANLEY, 1991; LIU, 1995). A perda de permeabilidade seletiva também seria responsável pela passagem do cálcio para a lamela média, contribuindo com a formação dos pectatos de cálcio (LIU, 1995).

2.7.3 Reações enzimáticas e não enzimáticas.

De acordo com alguns autores, durante o armazenamento o calor e a umidade elevada causariam a ativação das enzimas presentes no cotilédone, desencadeando inúmeras reações (Hincks & Stanley, 1986; Liu, 1995). Estas reações contribuiriam com o endurecimento provocando alterações no meio extracelular, danificando

membranas e alterando a estrutura dos componentes da parede celular e lamela média (Figura 8).

Figura 8: Modelo demonstrando a contribuição das principais enzimas em estudos envolvendo endurecimento de leguminosas.

Varriano-Marston e Jackson (1981) verificaram que feijões envelhecidos apresentavam várias alterações ultra-estruturais e perda da integridade do plasmalema e afirmaram que tais alterações poderiam estar associadas à ativação de diversas enzimas devido às condições de armazenamento adversas. Stanley e

Aguilera (1985) também atribuíram às enzimas parte da responsabilidade pelo HTC. Hincks e Stanley (1986) e Liu (1995), associaram o endurecimento à ação de múltiplos mecanismos ou múltiplos canais, que englobavam reações enzimáticas e não enzimáticas. Hincks e Stanley (1986) relacionaram o endurecimento a mecanismos semelhantes à lignificação. Liu, (1995) associou o HTC à ação de enzimas sobre as membranas, polissacarídeos de parede celular e materiais de reserva.

A fitase, assim como muitas outras enzimas (PME, lipase, lipoxigenase, protease e peroxidase), são citadas como responsáveis pelo processo de endurecimento. A ativação destas enzimas durante o envelhecimento causaria a hidrólise de lipídios, fitatos e proteína que, em conjunto com a ação de microorganismos e a formação de radicais livres, levariam à produção de ácidos, reduzindo o pH do meio (Liu, 1995). A redução do pH e a desesterificação das pectinas pela ativação da PME inibiria a β -eliminação, reação que ocorre somente em presença de calor e em meio que varia de neutro à alcalino. Na revisão feita por Liu (1995), é citado o trabalho de Albersheim (1959), que demonstra que é necessário que as carboxilas estejam metiladas para que a β -eliminação ocorra. Nesta mesma revisão, Liu (1995) tenta explicar através de diversos trabalhos, a relação entre o endurecimento, as teorias pectina-fitato e a importância da β -eliminação.

Varriano-Marston e Jackson (1981) sugeriram que a perda de integridade do plasmalema pode estar relacionada com o aumento da peroxidação no interior do citoplasma. De acordo com a teoria dos múltiplos canais de Liu (1995), a formação de radicais livres, a peroxidação lipídica, a deterioração da membrana e a formação de ácidos estariam relacionadas com o envelhecimento das sementes. Em revisão realizada por Reyes-Moreno e Paredes-López (1993), há a menção de diversos trabalhos relacionando à degradação de membranas à formação de radicais livres e à ação de lipoxigenases. Richard e Stanley (1991), verificaram alterações significativas na composição de lípidos em feijões HTC. Observaram aumento no conteúdo de ácidos graxos saturados e redução em ácidos graxos insaturados.

Segundo Jones e Boulter (1983), a ativação da fitase seria a principal responsável pela formação do pectato de cálcio insolúvel. A fitase (mioinositol

hexafosfato fosfohidrolase) hidrolisa o fitato liberando mioinositol, fosfato inorgânico e cátions bivalentes. Assim, ao degradar os fitatos presentes nos corpos protéicos, os íons bivalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) seriam liberados, passando através das membranas celulares danificadas (VARRIANO-MARSTON & JACKSON, 1981), alcançando a lamela média e formando pectatos insolúveis (SHOMER *et al.*, 1990; MOSCOSO *et al.*, 1984; HENTGES *et al.*, 1991; GARCIA-VELA & STANLEY, 1991; KILMER *et al.*, 1994). A liberação do cálcio também estimularia a ativação da PME, potencializando o fenômeno através do aumento do número de carboxilas livres (LIU, 1995).

Logicamente, o mais sensato seria atribuir o endurecimento a múltiplas causas e não somente a uma enzima. Seguindo esta tendência, as revisões mais recentes têm associado o HTC à ação de múltiplos mecanismos, envolvendo reações químicas e enzimáticas (HINCKS & STANLEY, 1986; LIU, 1995).

2.7.4 O papel dos compostos fenólicos e a teoria da lignificação.

A teoria da lignificação relaciona o desenvolvimento do endurecimento com a polimerização dos compostos fenólicos (provenientes principalmente das cascas, ricas nesta substância) mediada pela polifenoloxidase. Varriano-Marston e Jackson (1981), não descartaram a idéia de que a formação de ligações cruzadas ocorreria entre os compostos fenólicos e as proteínas da parede das células. Stanley e Aguilera (1985), associaram a formação de ligações cruzadas entre proteínas e fenólicos como sendo um processo precursor da lignificação. Ambos os casos levariam à redução da hidratação das sementes devido à impermeabilização das cascas e da lamela média.

Hincks e Stanley (1986) armazenaram feijão preto sob diferentes condições e mediram a quantidade de fenóis solúveis em metanol. Com isso verificaram que os compostos fenólicos eram menos extraídos à medida que o tempo de armazenamento aumentava e concluíram que o decréscimo na quantidade de fenóis extraídos devia-se ao comprometimento dos mesmos com a polimerização e lignificação. Srisuma *et al.* (1989), contudo, relacionaram o aumento do conteúdo de fenóis livres com o endurecimento da casca, bem como do cotilédone. De acordo com os autores, o aumento de fenóis livres estaria relacionado com a síntese ou a liberação a partir dos fenólicos ligados. Holberg e Stanley (1987) verificaram que em feijões duros há um aumento na quantidade de aminoácidos aromáticos livres. Associaram, então, o

aumento da concentração desses aminoácidos, (precursores dos ácidos hidroxicinâmicos) com a de síntese de polifenóis e participação no processo de lignificação.

Varriano-Marston e Jackson (1981) sugeriram que a lignificação ocorre através da ação da peroxidase e que o estágio inicial de lignificação pode ser a formação de ligações cruzadas entre as proteínas ricas em hidroxiprolina e os componentes da lamela média. Considerando-se que esta enzima encontra-se envolvida com a reação de polimerização dos compostos fenólicos, o aumento de sua atividade poderia estar associado ao processo de lignificação da lamela média e da parede celular.

Hincks e Stanley (1987) verificaram através de microscopia eletrônica que feijões endurecidos apresentavam grande deposição de dióxido de manganês no espaço intercelular, na parede celular secundária e na lamela média, de forma semelhante ao observado em tecidos vegetais durante o desenvolvimento da lignificação. Mafuleka *et al.* (1993) também relacionaram o aumento no conteúdo de lignina com o endurecimento de feijões vermelhos, embora não observassem a mesma relação com feijões brancos.

Rivera *et al.* (1989) estudaram a eficácia do tratamento com calor seco na inativação da peroxidase e sua utilidade na conservação das sementes e verificaram que a inativação da peroxidase por si só não impedia o desenvolvimento do HTC.

Stanley (1992) determinou o conteúdo de taninos condensados (leucoantocianinas polimerizadas) em amostras de feijão controle, armazenados à temperatura e umidade baixas e em amostras endurecidas pelo armazenamento à temperatura e umidade elevadas e verificou que as sementes armazenadas sob condições tropicais apresentavam redução na concentração de taninos extraídos em função do tempo. Deduziram então, que isto se devia à condensação dos taninos no tegumento e/ou migração destes para o cotilédone onde se ligariam aos componentes macromoleculares da parede e lamela média, causando o HTC. Neste trabalho, Stanley sugere que a oxidação dos taninos da casca restringiria a entrada de água nas sementes ao provocar a sua impermeabilização, contribuindo com o endurecimento.

Em acordo com a teoria de Stanley (1992), Reyes-Moreno *et al.* (1994) demonstram que o envelhecimento reduz significativamente o conteúdo de taninos das cascas ao passo que este aumenta no cotilédone. Reyes-Moreno *et al.* (1994) sugerem, então, que os taninos da casca migrariam para o interior do cotilédone, participando de reações de polimerização e reagindo com as proteínas e os carboidratos da semente. Há contudo, vários trabalhos que contradizem estas teorias e que são mencionados numa revisão feita por Liu (1995). Além disso, Srisuma *et al.* (1989) e Mafuleka *et al.* (1993), não observaram qualquer alteração no conteúdo de lignina nos feijões estudados.

Garcia *et al.* (1998) verificaram que o conteúdo de ácidos fenólicos em extratos metanólicos era maior em feijões normais do que em HTC. Entretanto, as pectinas solúveis em água apresentavam conteúdo de ácidos fenólicos ligados 2 vezes superior ao controle. Os resíduos insolúveis em água da parede celular de feijões HTC, também apresentaram conteúdo de ácidos fenólicos 4 vezes superior ao controle. Os dados obtidos com os espectros de infravermelho demonstraram que a parede celular de feijões endurecidos possui maior conteúdo de compostos fenólicos do que feijões normais. Bhatti (1990), verificou por microscopia a formação de coloração escura nas bordas de células de lentilhas endurecidas. Sugeriram então, que a coloração estava associada à formação de dióxido de manganês formado pela redução de KMnO_4 pela lignina e sugeriram que o endurecimento em lentilhas estava relacionado a mecanismos semelhantes à lignificação.

2.7.5 Teorias envolvendo os materiais de reserva no processo de endurecimento.

Parte da responsabilidade pelo endurecimento foi atribuída à menor disponibilidade de água no interior das células do cotilédone. A formação de ligações cruzadas entre os polissacarídeos, proteínas e fenólicos presentes na parede, bem como a oxidação lipídica, causariam a impermeabilização da parede celular e insolubilização das pectinas. Isto causaria restrição de entrada de água nas células, provocando limitação na desnaturação das proteínas e gelatinização do amido (LIU, 1995; GARCIA-VELA & STANLEY, 1989). Entretanto, muitos trabalhos verificaram alterações nas proteínas de reserva e no amido em feijões HTC, podendo significar que em feijões HTC o baixo grau de gelatinização do

amido e a desnaturação da proteína não estão relacionados apenas com a restrição de água nas células. Hentges *et al.* (1991) reafirmaram o modelo de pectina-cátion-fitato, ao verificar que o envelhecimento das sementes causava redução no conteúdo de fitato e aumento de pectinas de baixo grau de metilesterificação. Entretanto, não descartaram a possibilidade do amido e da proteína estarem envolvidos no fenômeno, visto que observaram redução na solubilidade da amilose e das proteínas em feijões HTC.

Muitos pesquisadores estudaram as alterações no comportamento do amido durante o desenvolvimento do HTC (VINDIOLA *et al.*, 1986; HOLBERG & STANLEY, 1987; HINCKS & col., 1987; PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 1988; GARCIA-VELA & STANLEY, 1989; GARCIA & LAJOLO, 1994; LIU, 1995). Paredes-López *et al.* (1988) verificaram que, no amido isolado de feijões envelhecidos, a quantidade de proteína era maior do que no amido de feijões novos e concluíram que em feijões envelhecidos há uma associação maior entre amido e proteína. Notaram, também, através de microscopia eletrônica, que os grãos de amido isolado de feijões duros apresentavam-se rachados e com fissuras e os feijões novos apresentavam grãos lisos e sem fissuras. Sugeriram, então, que a maior presença de grãos de amido danificados em feijões HTC poderia ser resultado da ação de enzimas. Os mesmos autores verificaram que a limitada absorção de água apresentada pelos grânulos de amido em feijões HTC ocorria somente quando este se encontrava compartimentalizado nas células do cotilédono, mas não quando o amido era isolado. Neste caso, estaria havendo impedimento da entrada de água na célula.

Garcia-Vela e Stanley (1989), afirmaram que quando o amido era isolado, o conteúdo de água não seria mais um fator limitante. Neste caso, a disponibilidade limitada de água nas células do cotilédono, causada pela impermeabilização da parede celular, reduziria a gelatinização do amido e a desnaturação protéica, causando o endurecimento. Porém, VINDIOLA *et al.* (1986) afirmaram que o endurecimento dependia da separação das células durante o cozimento e não da gelatinização do amido ou da disponibilidade de água.

Hohlberg e Stanley (1987) separaram 5 frações protéicas de feijões normais e HTC por permeação em gel. Neste trabalho, constataram aumento significativo de

proteínas de baixo peso molecular e redução de proteínas de alto peso molecular em feijões HTC. Isto sugeriu que estaria havendo degradação das proteínas da semente.

Estudos dos padrões de eletroforese das proteínas de feijões controle e envelhecidos também mostraram alterações em sua estrutura (HUSSAIN *et al.*, 1989; HENTGES *et al.*, 1991, LIU *et al.* 1992c). Hussain *et al.* (1989) trabalharam com eletroforese em gel (PAGE) para examinar o efeito do armazenamento à temperatura e umidade elevadas sobre as proteínas de feijão preto. Eles observaram o aparecimento de bandas novas de menor mobilidade, sugerindo a ocorrência de associação ou desnaturação das proteínas em feijões HTC.

Hussain e Bushuk (1991) estudaram alteração nos padrões de eletroforese em proteína de fava durante a germinação das sementes normais e HTC. Os autores verificaram que a proteína de favas HTC era menos passível de ser extraída, observando-se, também, alteração em seus padrões de eletroforese. A intensidade das bandas de menor peso molecular aumentaram em favas HTC em relação às sementes normais. Concluiu-se, portanto, que a proteína havia sofrido alteração em sua estrutura.

Hentges *et al.* (1991) também verificaram que o armazenamento a 29°C/65% UR causava decréscimo das frações de proteína solúveis em feijões e em caupi. Liu *et al.* (1992c) monitoraram a solubilidade e a temperatura de transição térmica da proteína de caupi armazenado à 0, 6, 12 e 18 meses à 30°C/64% UR, de forma a tentar explicar a relação entre a gelatinização do amido e as mudanças na solubilidade da proteína. Segundo Liu, em amostras de caupi armazenadas a 30°C/64% UR durante 18 meses, a solubilidade da proteína em água reduziu de 76,6 para 11,2% e sua temperatura de transição térmica reduziu de 100°C para 56°C. Entende-se a temperatura de transição térmica como sendo aquela em que as proteínas começam a coagular. Entretanto, a temperatura de gelatinização do amido permaneceu praticamente constante na faixa de 64 a 73°C. Como resultado, a temperatura de coagulação da proteína de reserva se tornou menor do que a temperatura de gelatinização do amido. Devido a redução na temperatura de transição térmica das proteínas, a sua coagulação ocorreria antes que ocorresse a gelatinização do amido, formando uma barreira que impediria a absorção de água pelos grânulos de amido. Em

feijões normais, a gelatinização do amido (64-73°C) prevaleceria, visto que a coagulação da proteína ocorreria somente à 100°C. Sementes normais apresentam proteína hidrossolúvel e termicamente mais estável, permitindo que o amido absorva água através da matriz protéica.

Paredes-López *et al.* (1988), não verificaram alterações significativas entre as temperaturas de gelatinização do amido isolado de feijões normais e endurecidos. Entretanto, Hohlberg e Stanley (1987) notaram aumento na temperatura de gelatinização em amido obtido de feijões armazenados nas três condições utilizadas no experimento: temperatura e umidade altas, médias e baixas. Assim, concluíram que o aumento na temperatura de gelatinização do amido não estava relacionado com o endurecimento em si, mas ao tempo de armazenamento e que as alterações físicas e estruturais observadas no amido eram provocadas pelo tempo e não pelas condições armazenamento. Garcia-Vela e Stanley (1989) também verificaram aumento na temperatura de gelatinização do amido em farinha de feijões endurecidos e atribuíram o fenômeno à baixa disponibilidade de água ou à formação de uma estrutura mais estável.

Garcia e Lajolo (1994) também observaram através de calorimetria (DSC), aumento na temperatura de gelatinização do amido isolado de feijões HTC-envelhecido (armazenados à temperatura e umidade locais por 5 anos), mas não verificaram o mesmo comportamento em feijões HTC-acelerado (armazenados a 40°C / 75% UR durante 2 meses).

Hincks e Stanley (1987) verificaram que feijões duros, quando aquecidos, tinham menor quantidade de amido gelatinizado em relação ao controle. Garcia e Lajolo (1994), por sua vez, observaram sob luz polarizada, uma birrefringência maior nos grãos de amido de feijões HTC-acelerado e HTC-envelhecido, confirmando a presença de um maior grau de cristalinidade nos grãos de amido. Observaram também, sob microscópio eletrônico, fraturas de cotilédone tratadas com amiloglicosidase e verificaram que as células periféricas de feijão, em ambos os casos (HTC acelerado e envelhecido), apresentavam uma quantidade maior de amido resistente ao ataque enzimático do que as amostras controle, confirmando a menor susceptibilidade do amido de feijões HTC.

2.7.6 Absorção de água

A absorção de água pelas sementes também foi relacionada com o fenômeno HTC (Varriano-Martón & Jackson, 1981; Hincks & Stanley, 1986; Aguilera & Rivera, 1992). Hincks e Stanley (1986) não observaram diferenças na absorção de água entre feijões HTC e controle. Porém, Aguilera e Rivera (1992) verificaram que, apesar da quantidade de água absorvida ser idêntica, a sua distribuição no cotilédone diferia. O comportamento da água absorvida foi estudado observado a sua perda durante a secagem das sementes. Neste estudo verificou-se que nas sementes HTC a água apresentava-se mais livre e a sua perda no processo de secagem era mais rápida. Concluíram que a água em feijões HTC estava concentrada no interstício, portanto, sua remoção era mais fácil. Em feijões normais, a água estaria concentrada no interior da célula, dificultando sua difusão para a superfície durante o processo de secagem.

Aguilera e Rivera (1992) sugeriram que a parede celular de feijões HTC era mais hidrofóbica do que as de feijões normais, por isso, a água ficaria mais concentrada no interstício do que no interior da célula. A impermeabilização da parede celular seria causada pela polimerização dos compostos fenólicos e pela formação de pectatos insolúveis. Varriano-Marston e Jackson (1981) estudaram o modo como a água penetrava no cotilédone utilizando água triciada, contudo não observaram diferença entre feijões normais e HTC.

Paredes-López *et al.* (1989) verificaram a alteração no conteúdo de água e na atividade de água (a_w) de duas cultivares de feijão armazenadas durante 120 dias a 32°C / 75% UR. A umidade de ambas as cultivares após 60 dias era de 15-15,5% e sua a_w , ao final do armazenamento, entre 0,754-0,759. Concluíram, então, que nesta faixa de umidade e a_w , as atividades enzimáticas e deteriorativas estariam favorecidas.

Sefa-Dedeh *et al.* (1979), não observaram diferenças no conteúdo de água absorvida entre sementes de caupi HTC e normais. Entretanto, Plhak *et al.* (1989) e Del-Valle *et al.* (1992) eliminaram a água presente entre a casca e o cotilédone e entre os cotilédones e verificaram que a absorção de água em sementes HTC era

reduzida. Plhak *et al.* (1989) notaram que feijões duros absorviam aproximadamente 25% menos água.

2.7.7 Os múltiplos mecanismos de ação.

A idéia de que o HTC estaria relacionado com múltiplos mecanismos de ação partiu da impossibilidade de se explicar o fenômeno com uma única teoria. A teoria pectina-cálcio-fitato não explicava porque o uso de agentes quelantes não causava reversão total do endurecimento. Alguns trabalhos demonstraram que não havia desesterificação das pectinas ou redução no conteúdo de fitato em amostras endurecidas, dessa forma foi sugerido que o HTC poderia ter uma componente relacionada com o metabolismo de fenólicos. Além disso, haviam muitas discrepâncias entre os trabalhos, o que fez com que Hincks e Stanley, (1986) propusessem múltiplos mecanismos de ação para explicar o fenômeno. Os autores sugeriram que o metabolismo de fenólicos seria a principal responsável pelo endurecimento, cabendo à perda de fitato, uma contribuição mínima ao fenômeno.

Por sua vez, Liu (1995) propôs uma teoria de múltiplos canais envolvendo reações enzimáticas e não enzimáticas. Baseando-se nos conhecimentos correntes sobre o endurecimento de leguminosas, o autor propôs múltiplos mecanismos de ação, delineando os eventos responsáveis pelo HTC e separando-os em três estágios. O início se daria durante o armazenamento sob condições inadequadas, estendendo-se pelo processo de maceração e, finalmente, exibido-se em sua totalidade no estágio final de cocção. Eventos enzimáticos e não-enzimáticos contribuiriam causando alterações na parede celular, nos materiais de reserva (amido e proteína) e danificando as membranas (Figura 9).

Os eventos não enzimáticos englobariam: **1)** formação de radicais livre, causando peroxidação lipídica e degradação das membranas, bem como a produção de ácidos; **2)** rearranjo das moléculas de amido causando aumento no grau de cristalinidade; **3)** redução da β -eliminação das pectinas devido ao aumento da acidez do meio. Os eventos enzimáticos seriam responsáveis pela: **1)** ativação das proteases causando formação de ácidos e desnaturação das proteínas.; **2)** ativação da fitase levando à degradação dos fitatos e liberação de cátions bivalentes que se difundiriam através das membranas danificadas, causando a formação de pectatos insolúveis; **3)**

ativação da PME que contribuiria com a desesterificação das pectinas, aumentando a formação de pectatos insolúveis e reduzindo a reação de β -eliminação (Figura 9). Como mencionado, as pectinas necessitam estar esterificadas e em pH de neutro a básico para que o processo de desestruturação ocorra, dessa forma, a redução do pH do meio participaria do processo ao impedir a β -eliminação e causar a coagulação das proteínas de reserva.

Figura 9: Modelo de mecanismo de múltiplos canais, mostrando eventos sequenciais que levam ao HTC em leguminosas. Retirado de LIU, (1995).

Segundo Liu, estes eventos seriam responsáveis por três aspectos distintos apresentados por feijões HTC: 1) resistência da parede celular em se degradar, 2)

resistência da parede celular em se solubilizar e, **3)** prevalência da coagulação das proteínas sobre a gelatinização do amido.

Hincks e Stanley (1986) ressaltaram os eventos enzimáticos, ao enfatizar o metabolismo de fenólicos e a ativação da peroxidase e da fitase. A ativação de peroxidase levando à formação de dímeros de ácido ferúlico já foi sugerida como sendo uma das causas da rigidez de tecidos vegetais (WALDRON *et al.*, 1997). A presença de ácido ferúlico esterificado às pectinas tem sido relatado na literatura (ISHII, 1997; RIDLEY *et al.*, 2001; CARNACHAN & HARRIS, 2000) (Figura 10). Entretanto, isto é mais freqüente em monocotiledôneas, especificamente em gramíneas. A maioria das frutas e vegetais consumidos pelo homem provém de dicotiledôneas. Poucas dicotiledôneas possuem grande quantidade de dímeros de ácido ferúlico esterificado às pectinas, salvo algumas exceções, como a beterraba (*Beta vulgaris*) e o espinafre (*Spinacia oleracea* L.) (MCNEIL *et al.*, 1984; FRY, 1983; CARNACHAN & HARRIS, 2000). Atualmente, métodos sensíveis de análise permitiram a identificação de pequenas quantidades de ácido ferúlico e de seu dímero em cenoura, maçã e feijão (WALDRON, *et al.*, 1997).

Figura 10: Dissacarídeos substituídos por feruloil éster, encontrados em pectina de espinafre. Retirado de MCNEIL *et al.*, (1984) e ISHII, 1997.

Inúmeros trabalhos atribuem o HTC a mecanismos semelhantes à lignificação e à polimerização de fenólicos. Todavia, apesar dos estudos realizados, até o presente momento, o mecanismo exato do endurecimento ainda não foi estabelecido.

Como parte dos mecanismos envolve a parede celular e a lamela média, tentou-se uma abordagem molecular que explicasse o fenômeno. Devido a importância do tamanho da molécula e da sua composição nas propriedades físico-químicas dos polissacarídeos, conseqüentemente na parede celular, os estudos se concentraram nesses dois aspectos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos principais desta pesquisa foram:

- 1) Caracterizar quimicamente os polissacarídeos de parede celular das sementes de feijão e verificar possíveis alterações em sua estrutura química, que possam ser responsáveis pelo fenômeno HTC.
- 2) Analisar os efeitos do processamento térmico sobre sementes normais e HTC e sobre seu conteúdo de fibras.

4 MATERIAIS

4.1 Amostra:

Feijão (*Phaseolus vulgaris* L., c.v. Carioca-Pérola), fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA); Serviços de Produção de Sementes Básicas (SPSB) da EMBRAPA - Goiânia (GO). Sementes de feijão colhidas no município de Goiatuba (GO) no início de setembro de 1999.

4.2 Materiais Especiais e Reagentes:

Extração da Parede Celular: Enzimas α -amilase termoestável; protease e amiloglicosidase de *Aspergillus niger* da Sigma-Aldrich Co. (EUA).

Fracionamento: Ácido 1,2-diaminociclohexano N,N,N',N' tetracético (CDTA), 98% e boroidreto de sódio (NaBH_4) da Sigma-Aldrich.

Cromatografia em fase gasosa e Espectrometria de Massa: Padrões: D-fucose; L-ramnose; L-arabinose; D-xilose; D-glicose; D-galactose; D-manose; mioinositol; diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila ($\text{CH}_3\text{-CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) grau espectrofotométrico; iodeto de metila; dimetilssulfóxido P.A. (DMSO); butilítio 2,5 M em hexano; iodometano 99,5%; metanol e clorofórmio grau espectrofotométrico; boroidreto de sódio deuterado (NaBD_4) da Sigma-Aldrich. Dimetilssulfóxido, grau de sililação, anidro (Pearce, EUA); tetracloreto de carbono (CCl_4), grau espectrofotométrico (Carlo Erba Reagenti, Itália).

Equipamentos: Coluna capilar de sílica fundida (SP-2330, Supelco, EUA) de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,20 μm de espessura de filme; Meyer N-evap-analytical evaporator (Organomation, EUA); cromatógrafo a gás (Hewlett Packard 6890, EUA), cromatógrafo a gás acoplado a analisador de massa quadrupolo com ionização por impacto de elétron (Hewlett Packard 5973) com injetor automático 7683, da mesma empresa; frascos de borosilicato de 4,0 mL, herméticos com tampas revestidas com Teflon[®] da Supelco[®] (EUA), cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) da Dionex (EUA)

Cromatografia de Troca Aniônica e Exclusão Molecular: Colunas de vidro C16/70 e XK 26/20; resinas Sepharose CL4B e Q-Sepharose[™] FastFlow da Amersham

Pharmacia Biotech (Suécia); padrões de peso molecular dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* da Fluka Chemie AG (Suíça).

Materiais Especiais: Filtros de fibra de vidro GF/F (Whatman, EUA); tubos de diálise Spectra/Por[®], Spectrum (EUA), MWCO 12.000-14.000; tubos de 30 e 15 mL (Corex[®], EUA); Celulase (endo-1,4- β -glicanase) e endopoligalacturonase (Megazyme International Ireland Ltd., Irlanda).

Demais Reagentes: Todos grau P.A da Merck Sharp & Dhome (Alemanha).

5 MÉTODOS

Após a colheita e recebimento, as sementes foram separadas em dois lotes:

Lote 1) Correspondendo às sementes controle (novas), congeladas no momento da chegada. As sementes foram descascadas manualmente e casca, cotilédone e embrião separados. As cascas e os cotilédones foram congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados a 80°C negativos até o momento do uso.

Lote 2) Armazenado a 30°C / 75 % de umidade relativa (UR). Os feijões foram mantidos em dessecadores contendo solução de NaCl saturada no interior de câmara BOD durante período de 8 meses. Para garantir a presença de oxigênio e homogeneidade das condições de armazenamento, os dessecadores foram abertos e as sementes revolvidas uma vez por semana. Ao final do armazenamento, as amostras foram tratadas da mesma forma que o lote1.

Amostras cozidas: Parte dos cotilédones do lote 1 e 2 foram macerados por período de 6h em água deionizada na proporção de 1 parte feijão para 5 de água (p/p) e cozidos na mesma água até que houvesse desestruturação dos tecidos. O volume de água foi completado quando necessário e, ao final, as amostras foram resfriadas, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e trituradas em moinho de facas.

5.1 Umidade

A determinação de umidade foi realizada em triplicata utilizando-se farinha de feijão integral. As amostras foram colocadas em estufa aquecida a 105°C, por 12h e deixadas em dessecadores contendo sílica gel. As amostras foram pesadas e dessecadas

até que o peso ficasse constante, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz para farináceos (1985).

5.2 Composição centesimal

A composição centesimal da farinha do cotilédone e da casca foi realizada de acordo com a AOAC (1995).

5.2.1 Determinação de fibras

A determinação de fibras solúveis e insolúveis foi realizada de acordo com a metodologia modificada de Prosky *et al.* (1988).

5.3 Tempo de cocção

As sementes foram maceradas durante 16h em água deionizada na proporção de 1:4 (semente:água; p/v). O tempo de cocção da semente foi obtido utilizando-se cozedor tipo Mattson (MATTSON, 1946). O teste foi realizado em quadruplicata, utilizando-se 25 sementes 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 98,8g caíssem perfurando as sementes. A média entre as quatro determinações foi calculada.

5.4 Extração dos polímeros da parede celular

5.4.1 Obtenção dos polímeros de parede celular

A fração insolúvel em água (FIA) de feijões novos e endurecidos foi obtido utilizando-se método enzimático químico adaptado dos trabalhos de Prosky *et al.* (1988), McLaughing e Gay (1990) e Carpita (1983).

Cotilédones e cascas foram triturados em moinho de facas e passados em tamis de 0,5 mm. Cerca de 1g de farinha foi pesado em tubos Corex[®] de 30 mL e desengordurados com 15 mL (2x) de CHCl₃:MeOH (1:1, v/v) em banho a 45°C por 30 min. As suspensões foram centrifugadas a 9.000 g e os sobrenadantes descartados. Os resíduos foram lavados consecutivamente com 15 mL (2x) de MeOH e 15 mL (2x) de acetona. Os sobrenadantes foram descartados e os resíduos evaporados a 45°C até a secura e triturados com 30 mL de tampão fosfato 0,08M / pH 6,0 em homogeneizador

de tecidos com pistilo de Teflon[®]. As amostras foram transferidas para beckeres de 100 mL e incubadas a 100°C com 0,1 mL de α -amilase termorresistente (Sigma-Aldrich, EUA) durante 30 min. A seguir, as amostras foram tratadas com 0,1 mL de protease contendo 50 mg / mL (Sigma-Aldrich) a 60°C em pH 7,5 e com 0,3 mL de amiloglicosidase (Sigma-Aldrich) em pH 4,3 sob agitação constante por período de 1h à cada enzima adicionada.

As suspensões contendo o hidrolisado foram centrifugadas a 9.000 g por 10 min e os resíduos obtidos foram lavados (2x) com 10 mL de água destilada. Os sobrenadantes e as águas de lavagem foram filtrados em filtros de fibra de vidro e dialisados através de membrana Spectra/Por[®] MWCO 12.000-14.000 (Spectrum, EUA) em H₂O destilada durante 48h. O material obtido após a liofilização foi denominado de fração polissacarídica solúvel em água (FSA).

Os resíduos obtidos da hidrólise enzimática foram tratados (2x) com 15 mL de tampão fosfato 0,5 M / pH 7,2 para retirar resíduos de proteína e lavados (2x) com 15 mL de H₂O destilada. O amido não hidrolisado pelas enzimas foi extraído tratando as amostras com (2x) 15 mL de DMSO (90%, v/v) durante 20 min sob efeito de ultra-som e (2x) com 10mL de DMSO a 90%, sendo lavados exaustivamente com água destilada, ressuspensos em água, liofilizados e pesados, constituindo a fração insolúvel em água (FIA). Entre as etapas de extração e lavagem, as suspensões foram centrifugadas a 9.000 g por 10 min para separar as fases.

5.4.2 Fracionamento da fração insolúvel em água (FIA)

A FIA foi fracionado segundo a metodologia descrita por Carpita (1983), inicialmente com solução quelante (CDTA) com finalidade de extrair as pectinas ligadas através de pontes de Ca²⁺. A pectina imobilizada por ligações éster, lábeis em meio básico (ligações cruzadas com ácido ferúlico) foram extraídas em meio alcalino de baixa molaridade. Hemiceluloses e pectinas fortemente ligadas foram removidas com soluções de álcali concentrado.

Sessenta miligramas de FIA foram extraídos com 15 mL de CDTA 0,05M / pH 6,5 por 16h à temperatura de 20°C sob agitação na presença de gotas de tolueno em tubos de centrífuga (Corex[®]). A mistura foi centrifugada a 9.000 g / 10 min e o sobrenadante filtrado em filtros de fibra de vidro sob vácuo. O filtrado foi dialisado

em água destilada por 72 h, liofilizado e pesado, correspondendo à fração solúvel em CDTA (FCDTA). O resíduo foi extraído consecutivamente com 15 mL de NaOH 0,01; 0,50; e 1,0 M por 1h, na presença de 3 mg/mL de NaBH₄ à 20°C sob atmosfera de N₂ e agitação constante e com NaOH 4,0 M por 16h nas mesmas condições

Os sobrenadantes referentes a cada concentração de hidróxido, obtidos após a centrifugação a 9.000 g / 10min, foram neutralizados com ácido acético glacial e dialisados separadamente em água destilada por 48h, sendo em seguida liofilizados e pesados correspondendo às frações H0,01; H0,5; H1 e H4. O resíduo final foi lavado exaustivamente com água destilada, liofilizado e pesado, correspondendo ao resíduo rico em celulose.

5.4.3 Fracionamento dos polissacarídeos da fração solúvel em água (FSA)

As frações polissacarídicas solúveis em água (FSA), obtidas de feijões T₀ e envelhecidos por 8 meses, foram fracionadas por cromatografia de troca aniônica em coluna XK 26/20 de 26 cm x 20 mm (Pharmacia, Suécia) empacotada com resina Q-Sepharose FastFlow (Pharmacia). Cerca de 20 mg de amostra foram injetados e eluídos com tampão fosfato 0,02 M; pH 6,8 contendo 5mM de NaN₃ e 20mM de NaCl, sob fluxo de 0,5 mL/min. Após 3h:15min de corrida isocrática foi aplicado gradiente de NaCl (20mM-1M), finalizando a corrida em 13h. Frações de 5ml de eluente foram recolhidas ao longo da corrida e os picos identificados através da determinação de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956) e ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991) após a hidrólise ácida dos polissacarídeos (item 4.5.1). As frações que referentes a cada pico foram reunidas e submetidas à diálise em membrana Spectra/Por[®] MWCO 12.000-14.000 (Spectrum) em água destilada. Ao final, o material foi dialisado, liofilizado e analisado quanto ao conteúdo de açúcares neutros e ácidos urônicos.

As etapas de extração e fracionamento dos polissacarídeos encontram-se resumidas na Figura 11.

Figura 11: Fluxograma de extração, fracionamento e análise das frações polissacarídicas da parede celular. **FSA**, fração polissacarídica solúvel em água; **FIA**, fração polissacarídica insolúvel em água, **H0,01**; **H0,5**, **H1** e **H4**, frações solúveis em hidróxido de sódio. O resíduo rico em celulose foi hidrolisado com ácido trifluoro acético 2M (TFA), o sobrenadante analisado quanto ao conteúdo de açúcares neutros e ácidos urônicos, o resíduo foi tratado com H₂SO₄, neutralizado e analisado quanto ao conteúdo de açúcares por HPLC fornecendo o conteúdo de glicose referente à celulose.

5.5 Análise dos polissacarídeos

5.5.1 Hidrólise ácida dos polissacarídeos.

Em frasco hermético de borosilicato (Supelco, EUA) foram adicionados 850 μL de material eluído e 50 μL de H_2SO_4 72% (p/p). A mistura foi hidrolisada a 120°C durante 1h (SAEMAN *et al.*, 1954) e, ao final, neutralizada com 100 μL de NaOH 50% (p/v). O hidrolisado obtido foi analisado quanto ao conteúdo de ácidos urônicos (AU) e açúcares totais (AT)

Na análise com HPLC, cerca de 2 mg de material liofilizado foi solubilizado em 850 μL de água deionizada e submetido à hidrólise como descrito acima.

5.5.2 Determinação de ácidos urônicos (AU)

A determinação de AU foi realizada de acordo com Filisetti-Cozzi e Carpita, (1991). Em 400 μL de amostra (0,5mg/mL) foi acrescentado 40 μL de solução de sulfamato de potássio-ácido sulfâmico 4M (pH 1,6) sob banho de gelo. À mistura foi adicionado 2,4 mL de tetraborato de sódio 0,075M em ácido sulfúrico concentrado. A solução resultante foi incubada durante 20 min a 100°C . Ao final, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e 40 μL de solução de m-hidroxidifenil 0,15% (p/v) em NaOH 0,5% (p/v) adicionados sob agitação. Após 5 min, há o desenvolvimento de coloração rosada (estável por 1h) com absorção máxima a λ de 525 nm. A concentração de ácidos urônicos da amostra foi determinada contra branco e curva padrão contendo 50, 100, 150 e 200 nmoles de ácido galacturônico.

5.5.3 Determinação de açúcares totais (AT)

O conteúdo de açúcares totais dos polímeros e de suas frações foi determinado através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Em 200 μL de amostra foram adicionados 200 μL de solução de fenol 5% (p/v) em água, mais 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos a absorbância máxima foi medida no λ de 490 nm contra branco. A curva de calibração foi obtida utilizando-se padrão contendo 100, 200, 300 e 400 nmoles de arabinose.

5.5.4 Determinação de açúcares neutros por cromatografia em fase gasosa

5.5.4.1 Preparo do acetato de alditol

Cerca de 1 mg de produto liofilizado foi hidrolisado durante 90 min a 120°C com 1 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 2 M, contendo 1 µmol de inositol por mL (padrão interno) em frascos de borosilicato com tampas revestidas de Teflon[®] (ALBERSHEIM, 1967). O hidrolisado foi resfriado à temperatura ambiente e 1 mL de TBA adicionado. A mistura foi evaporada sob fluxo de N₂ em banho a 45°C.

Os monômeros liberados foram reduzidos e acetilados de acordo com Blakeney *et al.*, (1983) com modificações propostas por Carpita e Whittern (1986). Ao hidrolisado adicionou-se 0,5 mL de DMSO contendo 20 mg/mL de NaBH₄ e 100 µL de NH₄OH 1,0 M. A mistura foi incubada em banho de água a 45°C por 90 min e neutralizada com 100 µL ácido acético glacial. Em seguida, adicionou-se à mistura 100 µL de 1-metilimidazol (catalisador) e 0,5 mL de anidrido acético. Posteriormente, esta mistura foi incubada durante 30 min em banho de água a 45°C. Ao produto final, adicionou-se 1,5 mL de água finalizando-se a reação. O acetato de alditol foi extraído da mistura aquosa com duas alíquotas de 0,5 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) sob agitação vigorosa. Os extratos orgânicos foram recolhidos em frascos novos e lavados com 1 mL de H₂O (2x), transferidos para frascos secos e evaporados sob fluxo de N₂ a 45°C.

Os derivados acetilados foram dissolvidos em acetato de etila e analisados em cromatógrafo a gás com detetor de ionização de chama (FID) (Hewlett Packard 6890, EUA) utilizando-se coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno, com 20 µm de espessura de filme (SP-2330, Supelco, EUA). O gradiente de temperatura foi programado em 170-240°C (10°C / min), mantendo a temperatura final durante 20min. A temperatura do injetor e do detetor foram fixadas em 250°C. Como padrão utilizou-se solução contendo 3 µmoles de cada açúcar padrão, com 1 µmol de mioinositol por mL como padrão interno. Para a obtenção dos resultados foram realizados os seguintes cálculos:

Eq.(1)

$$RF = \frac{\text{Área}_{\text{padrão interno}}}{\text{Área}_{\text{açúcar padrão}}} \times 3$$

Eq.(2)

$$\mu\text{mol}_{\text{açúcar}} = \frac{\text{Área}_{\text{açúcar}} \times RF}{\text{Área}_{\text{padrão interno}}}$$

Eq.(3)

$$\mu\text{g}_{\text{açúcar}}/\text{mg}_{\text{parede}} = \frac{\mu\text{mol}_{\text{açúcar}} \times \text{PM}_{\text{açúcar}}}{m_{\text{parede}}}$$

Onde: PM = peso molecular

m = massa em mg

A reação de redução e acetilação e as etapas de preparo do derivado acetilado encontram-se apresentadas na Figura 12.

Figura 12: Hidrólise e acetilação de açúcares neutros. **TFA**, ácido trifluoroacético; **TBA**, terc-butil álcool; **DMSO**, dimetilssulfóxido

5.5.5 Análise de ligações

5.5.5.1 Preparo do acetato de alditol parcialmente metilado (AAPM)

A metilação dos polissacarídeos foi realizada segundo a metodologia de Carpita e Whittern (1986).

Em tubos Corex[®] (EUA) de 15mL contendo barra magnética foram pesados 1mg de amostra que foram posteriormente acondicionados sob vácuo em dessecador contendo pentóxido de fósforo (P₂O₅) anidro. Após 3 dias o vácuo foi quebrado através de sistema contendo CuSO₄ anidro e os tubos contendo as amostras foram imediatamente fechados com rolhas de borracha. O ar foi retirado dos tubos e cerca de

1 mL de DMSO (grau de sililação) foi injetado com o auxílio de seringa de vidro *gas tight*. As suspensões foram mantidas sob atmosfera de N₂ em banho a 50°C sob ultra-som durante 2h. Ao final, os sistemas foram mantidos sob fluxo de N₂ e agitação constante e cerca de 0,5mL de butilítio 2,5 M foi injetado lentamente em cada tubo. O sistema foi mantido sob agitação constante por período de 3 h ou até o desenvolvimento de cor azulada. A seguir, foram adicionados, lentamente, cerca de 0,5 mL de CH₃I e as misturas foram mantida sob agitação por 1h até o que houvesse o desenvolvimento de coloração amarelada, indicando o término da reação. O processo foi interrompido, ao final, com a adição de 5 mL de H₂O e o polissacarídeo metilado foi extraído, consecutivamente, com 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v). Os extratos orgânicos foram lavados com água destilada (5x), transferidos para frascos herméticos com tampas revestidas com Teflon® e secos sob fluxo de N₂ em banho a 45°C. Os polissacarídeos parcialmente metilados foram hidrolisados, reduzidos com NaBD₄ e acetilados como descrito no item anterior (4.5.4).

5.5.5.2 Purificação do acetato de alditol parcialmente metilado (AAPM)

O acetato de alditol parcialmente metilado (AAPM) foi purificado segundo metodologia de Gibeaut e Carpita (1991).

A mistura estoque destinada à purificação foi preparada adicionando-se volumes iguais de CCl₄ e metanol-água (40:60, v/v) em frasco de reagente hermético. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso durante 1 h para a separação das fases.

Os AAPM(s) foram transferidos para frascos cônicos com o auxílio de 200 µL de acetato de etila e secos sob fluxo de N₂ em banho a 45°C. Foram adicionados 100 µL da fase de MeOH 40%, mais 10 µL da fase de CCl₄ da mistura estoque aos extratos secos. As misturas foram agitadas vigorosamente e centrifugadas a 4.000 g por 10 min. As fases metanólicas foram transferidas para frascos cônicos novos e secos sob fluxo de N₂. O AAPM foi ressuspendido em 100µL de diclorometano (CH₂Cl₂) grau espectrofotométrico e cerca de 1µL da amostra foi injetado em cromatógrafo a gás Hewlett Packard 6890 munido de injetor automático série 7683,

acoplado a analisador de massa quadrupolo com ionização por impacto de elétron (Hewlett Packard, série 5973). O injetor foi mantido a 225°C e o gradiente de temperatura foi programado com velocidade de subida de 2°C/min entre o intervalo de 160 a 210°C e de 5°C/min no intervalo até 240°C, a temperatura máxima foi mantida por 10 min. Como gás de arraste utilizou-se hélio ultrapuro, com pressão constante de 180 kPa.

O processo de metilação dos polissacarídeos e acetilação dos monômeros parcialmente metilados está apresentada na Figura 13.

Figura 13: Passos da preparação de acetato de alditol parcialmente metilado. O polímero é dissolvido solução de álcali forte não aquoso para a formação do íon alcóxila nos $-\text{OH(s)}$ livres. Com a adição de CH_3I forma-se o produto metilado que, após hidrólise com TFA é reduzido com NaBD_4 formando alditóis marcados no C-1. Os grupos hidroxila anteriormente comprometidos com as ligações glicosídicas são acetilados, revelando a posição das ligações (adaptado de CARPITA e SHEA em BIERMANN MCGINNIS, 1990 e BRETT e WALDRON, 1996). Como o TFA não hidrolisa celulose, a glicose da análise de ligações é referente apenas à hemicelulose.

5.5.6 Análise de açúcares por HPLC

Para obter a composição total de açúcares do resíduo, procedeu-se à hidrólise do material com H_2SO_4 (como citado no item 4.5.1.) e após a neutralização, parte do hidrolisado foi utilizado na determinação de AU e o restante analisado por cromatografia a líquido de alto desempenho (HPLC).

O conteúdo de celulose foi conseguido, hidrolisando-se 2 mg do resíduo resultante do fracionamento da FIA com TFA 2M por 1h a 120°C em frascos herméticos. A suspensão foi centrifugada a 2.000 g e o resíduo foi hidrolisado com H_2SO_4 2 M e neutralizado com NaOH. O hidrolisado foi diluído em água deionizada e filtrados através de membrana de $0,45\mu\text{m}$ de poro (Millipore, EUA). Os monômeros foram separados em coluna CarboPac PA10 de 4 x 250 mm, provida com a pré coluna correspondente (Dionex, EUA), utilizando-se cromatógrafo DX 500 (Dionex) equipado com detector eletroquímico de pulso amperométrico (PAD), munido com eletrodo de ouro. A corrida foi realizada no modo isotérmico (25°C) e isocrático, utilizando fase móvel de NaOH 2mM sob fluxo a $1,0\text{mL}/\text{min}$. O volume de amostra injetado foi de $25\mu\text{L}$. Como padrões de calibração foram utilizados D-fucose, L-arabinose, D-ramnose, D-galactose, D-glicose, D-xilose e D-manose (Sigma-Aldrich, EUA). A calibração foi realizada com o uso de padrões externos. O princípio baseou-se no fato do tratamento com TFA hidrolisar quase a totalidade das pectinas e hemicelulose, não sendo suficiente para hidrolisar a celulose.

5.5.7 Tratamento enzimático

Os polímeros obtidos após o fracionamento da FIA e da FSA foram hidrolisados com EPG e celulase (endo-1,4- β -glicanase) de *Trichoderma sp* (Megazyme, Irlanda). Os hidrolisados foram precipitados levando-se as misturas à concentração de 80% em etanol. Os precipitados foram liofilizados e os sobrenadantes etanólicos secos sob fluxo de N_2 a 45°C . Os produtos obtidos foram analisados por espectrometria de massa, após a permetilação de seus monômeros.

As frações solúveis em água (FSA), em base fraca (H0,01; H0,5 e H1) e base forte (H4), tratadas com EPG (Megazyme), também foram eluídas em coluna de exclusão molecular C16/70 de $70\text{cm} \times 16\text{mm}$ (Pharmacia, Suécia) empacotada com

resina Sepharose CL4B (Pharmacia), equilibrada com NaOH 0,2 M contendo 20 mM de azida.

5.5.7.1 Tratamento com celulase

Em solução contendo 1mg/mL de material, foram adicionados 40 μ L de tampão acetato de amônio pH 5 / 1 M e 10 μ L de solução de celulase de *Trichoderma sp* (Megazyme, Irlanda) contendo 500 U/mL. A solução foi incubada a 30°C por 24h. A reação foi interrompida submetendo as amostras em banho fervente por 10 min (Silva, 2001^a). O hidrolisado foi precipitado levando-se a mistura à concentração de 80% em etanol em banho a 60°C / 30min e em seguida, em banho de gelo.

5.5.7.2 Tratamento com Endopoligalacturonase (EPG)

Em 1mg de material foram adicionados 300 μ L de tampão acetato de sódio 0,05M pH 5, 190 μ L de água destilada e 10 μ L de EPG (Megazyme) contendo 100U/mL. A mistura foi incubada à 30°C por 24 h. Ao final, a reação foi interrompida submetendo as amostras em banho fervente por 10 min (Silva, 2001^b). O hidrolisado foi precipitado como descrito no item anterior.

5.5.7.3 Avaliação do estado do hidrolisado

Os hidrolisados foram solubilizadas em H₂O : MeOH : ácido acético, 10:1:1 (v/v/v) e aplicados em analisador de massa com ionização por electrospray triplo quadrupolo Quattro II da Micromass UK Ltd. (Reino Unido), com leitura no modo positivo. A voltagem do capilar foi fixada em 3,5 kVolts, a fonte em 100°C. O gás utilizado para a secagem, N₂ e a pressão de trabalho 1,1x10⁵ mBar. A faixa de leitura foi de m/z 500-2.000.

5.5.8 Perfil de pesos moleculares dos polissacarídeos.

O peso molecular das frações polissacarídicas foi obtido por cromatografia de exclusão molecular, utilizando-se coluna C16/70 de 70cmx16mm (Pharmacia, Suécia) empacotada com resina Sepharose CL4B, faixa de fracionamento para dextrano 30-5.000 kDa (Pharmacia). As frações FSA, FCDTA e H0,01 foram eluídas com NaOH 0,2 M contendo 20 mM de NaN₃ e as frações H0,5; H1 e H4 com NaOH

0,5M com 20 mM de NaN_3 . O fluxo de eluente foi fixado em 0,2 mL/min. Frações de 2mL foram coletadas e os picos detectados através da determinação de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956), como registrado no item 4.5.3, após hidrólise do polissacarídeos (item 4.5.1). A curva de calibração foi obtida com dextrano grau padrão (Fluka, Suíça) de pesos moleculares médios 3.500, 770, 410, 148 e 49 kDa (Figura 14).

Figura 14: Curva de calibração da coluna de Sepharose CL4B, usada para determinação do peso molecular dos polissacarídeos obtidos da parede celular. V_0 , volume morto; V_e , volume de eluição total.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Composição do feijão.

Os feijões Carioca-Pérola utilizados são constituídos por 1,5% de embrião, 88,6% de cotilédone e 9,9% de casca. A porcentagem inicial de umidade do cotilédone era de $13,33 \pm 0,17$ e da casca $1,75 \pm 0,16$.

Os cotilédones têm 19% de fibra insolúvel e 4% de fibra solúvel em peso seco. A casca possui 67% de fibra insolúvel e 4% de fibra solúvel. A quantidade de lípidos é de 2% no cotilédone e 0,6 % nas cascas. Os feijões Pérola possuem 24% de proteína provenientes do cotilédone e 9% das cascas. O conteúdo de cinzas é elevado e corresponde a 5% na casca e no cotilédone (Tabela 1).

Tabela 1: Composição do cotilédone e da casca de feijão Carioca-Pérola. Teores de umidade, proteína, cinzas, lípidos e fibras em peso seco.

Amostra	Umidade	Proteína	Cinzas	Lípides	Fibra %(p/p)		
					Solúvel	Insolúvel	Total
% (p/p)							
Cotilédone	7,52±0,15	23,91±0,58	4,78±0,05	1,96±0,06	3,87±0,13	19,03±0,25	22,9
Casca	2,8±0,22	9,19±0,08	5,10±0,20	0,6±0,08	4,09±0,95	66,96±0,50	71,05

Dados fornecidos em peso seco, umidade obtida da farinha de feijão no momento da análise.
(n=3)

6.1.1 Proporção de polímeros extraídos.

No feijão integral cru, o cotilédone contribui com 9,6% de fração insolúvel em água (FIA) e 5,5% de fração solúvel em água (FSA), perfazendo 15,2% de polímeros provenientes da parede celular. As cascas contribuíram com 7% de FIA e 0,3% de FSA, representando um total de 7,4% de polímeros de parede (Figura 15). O feijão integral possui, no total, 16,6 % de FIA e 5,9% de FSA (Figura 15).

Analisando cada componente separadamente, verifica-se fração insolúvel em água (FIA) corresponde a 11% do cotilédone e os polissacarídeos solúveis em água

(FSA) a 6%. As cascas de feijões são compostas de 71% de material insolúvel em água e apenas 3% de polímeros solúveis em água.

Figura 15: Conteúdo dos polímeros da fração insolúvel em água (FIA) e da fração solúvel em água na composição do feijão. Valores dados em porcentagem em relação ao feijão integral (n≥3).

Na dieta, o feijão participa fornecendo grande quantidade de fibra insolúvel, a maior parte desta fibra é proveniente dos polissacarídeos que compõem a parede celular. A quantidade total de polímeros insolúveis em água (provenientes da casca e do cotilédone) é quase três vezes superior ao de material solúvel (Figura 15).

6.2 Composição dos polímeros da cascas

6.2.1 Composição de monossacarídeos

Os polissacarídeos da FSA obtidos da casca são compostos por quantidades elevadas de arabinose (38%) e AU (21%), médias de manose (10%), galactose e xilose (11 e 12%) e pequenas de fucose, ramnose e glicose (0,1; 4 e 5%, respectivamente) (Figura 16).

A FIA da casca é composto por grande quantidade de xilose (35%) e arabinose (22%), médias de AU (14%), galactose e celulose (ambos, 12%) e pequenas de glicose (4%), ramnose (2%), manose (0,2%) e fucose (0,4%) (Figura 16).

Comparando os dados obtidos com o de outras leguminosas encontradas na literatura, são observadas algumas diferenças. Por exemplo, Weightman *et al.* (1995) encontraram, aproximadamente, 60% de glicose e apenas 4% de arabinose nos

polímeros solúveis em água, provenientes da casca de ervilhas. Os polímeros da FSA de feijão Pérola possuem 38% de arabinose e apenas 5% de glicose, ou seja, o oposto do apresentado por ervilhas.

Diferenças também foram encontradas ao comparar o perfil de carboidratos com dados obtidos da literatura. Champ *et al.*, (1986) observaram grande quantidade de celulose nas cascas (41%). Entretanto, esta observação não encontrou respaldo nos resultados obtidos de feijão Carioca-Pérola, que mostraram que a celulose representa apenas 12% da FIA da casca (Figura 16). Além disso, o feijão Pérola também possui quantidade de arabinose cerca de 26% superior. Entretanto, quando os dados são comparados com os obtidos por Gooneratne *et al.* (1994^a) com *Vigna*, semelhanças podem ser observadas. As frações insolúveis em água, proveniente da parede celular da casca de *Vigna mungo* e *Vigna radiata*, são constituídas por grande quantidade de xilose, AU e arabinose. Nos feijões Pérola, os conteúdos de arabinose e xilose da fração insolúvel em água também são elevados, embora a quantidade de glicose tenha se mostrado superior ao encontrado em *Vigna*. Apesar de existir pequenas diferenças entre *Vigna* e feijão em relação à composição dos polímeros insolúveis em águas, observam-se mais semelhanças do que diferenças, principalmente ao comparar os polímeros solúveis em água.

Figura 16: Composição de monossacarídeos dos polímeros da parede celular da casca de feijão. **FIA**, material celular; **FSA**, fração solúvel em água; **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente de celulose, ($n \geq 3$)

Gooneratne *et al.* (1994^a) sugeriram que a grande quantidade de xilose 4-ligada encontrada em *Vigna* era proveniente de xilanos. Em feijões também foram encontradas quantidades elevadas de xilose e arabinose que também podem estar relacionadas à presença de xilanos. Considerando-se que a quantidade de glicose encontrada em feijões é muito baixa em relação à de xilose presume-se que uma porção considerável da xilose seja proveniente de xilanos e não de xiloglicanos (Figura 16).

6.2.2 Perfil de ligações dos polissacarídeos da casca

Os polissacarídeos presentes na FIA de casca de feijão eram compostos por glicose 4,6- (4%) e 4-ligada (40%), 4-xilp+2-xilp (26%) e galactose 2-ligada (12%) (Tabela 5). Os dados sugerem presença de xiloglicanos pouco ramificados, o que é coerente pois facilita as interações interpoliméricas, tornando-o pouco solúvel. A predominância de glicose 4-ligada (40%) também pode estar associada à presença de celulose; embora o tratamento com TFA não favoreça a hidrólise da celulose, é possível que a metilação tenha tornado parte do produto susceptível à hidrólise ácida. Parte da xilose provavelmente pertence a xiloglicanos, contudo, a maior parte originou-se de xilanos, principalmente os provenientes do FIA. A presença de xilanos nas cascas de sementes de leguminosas também foi observada por Stollen-Smits *et al.* (1995) e Ryden e Selvendran, (1990)

Gooneratne *et al.* (1994a) também sugeriram a presença de xilanos em casca de *Vigna mungo*. De acordo com a literatura os glicuronoarabinoxilanos (GAX) encontrados em dicotiledôneas são constituídos por uma cadeia principal de xilose 1,4-ligada, contendo ramificações de arabinose e ácido glicurônico ligados no C-2 de alguns resíduos de xilose (Carpita & Gibeaut, 1993; Brett & Waldron, 1996; Carpita & McCann, 2000). A xilose 4-ligada encontrada no FIA está associada à presença de xilanos. Como não foram detectadas quantidades razoáveis de arabinose terminal e de xilose 2,4-ligada, conclui-se que a molécula é linear e possui ramificações, o que a torna pouco solúvel em água (Tabela 5).

Tabela 2: Análise de ligações dos polissacarídeos das fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) da casca de feijões controle

Polissacarídeo relacionado	Monômeros	FIA	FSA
		% Molar	
<i>Arabinanos</i>	<i>t-araf</i>	-	1,90
	5- <i>araf</i>	16,87	60,84
	3,5- <i>araf</i>	4,44	2,98
	2,5- <i>araf</i>	1,05	2,53
	arapentaOAc	-	0,41
<i>Xiloglicanos</i> <i>Xilanos</i>	<i>t-glcp</i>	-	2,66
	4- <i>glcp</i>	36,90	0,56
	4,6- <i>glcp</i>	3,34	-
	<i>t-xilp</i>	-	1,38
	4- <i>xilp</i> +2- <i>xilp</i>	26,23	11,95
	<i>t-fuc</i>	-	1,06
	<i>t-galp</i>	-	2,93
	2- <i>galp</i>	11,17	0,21
Galactanos AGII RGI	3- <i>galp</i>	-	1,22
	4- <i>galp</i>	-	0,09
	6- <i>galp</i>	-	1,58
	2,4- <i>galp</i>	-	0,17
	2- <i>ram</i>	-	1,19
-	2,4- <i>ram</i>	-	0,69
	<i>t-manp</i>	-	5,52
	2- <i>manp</i>	-	0,14

A composição é dada em porcentagem molar após análise da estrutura química por espectrometria de massa. Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. **FIA**, material celular; **FSA**, fração solúvel em água. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo C-1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose. (n = 3).

Quantidades significativas de arabinose 5-ligada foram encontradas no FIA e principalmente na FSA (61%) da casca (Tabela 5). Sobretudo na FSA, o conteúdo de arabinose 2,5- e 3,5-ligadas eram baixos, indicando uma estrutura pouco ramifica e de cadeia longa, dada a quantidade reduzida de arabinose terminal. Entretanto, na fração insolúvel os arabinanos mostraram-se mais ramificados, visto que continham 17% de 5-*araf* e 5% de resíduos contendo pontos de ramificação (Tabela 5).

6.3 Composição dos polímeros do cotilédone

Os polissacarídeos da FSA do cotilédone eram compostos por quantidades elevadas de arabinose (42%), médias de manose e ácidos urônicos (ambos, 13%), galactose e xilose (ambos, 11%) e pequenas de ramnose e glicose (2 e 7%,

respectivamente). Valores mínimos de fucose também foram encontrados (0,6%) (Figura 17).

Figura 17: Composição de monossacarídeos dos polímeros da parede celular do cotilédone de feijão. **FIA**, material celular; **FSA**; fração solúvel em água; **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente de celulose, (n ≥ 3)

A FIA obtida do cotilédone de feijão é formada por quantidades elevadas de arabinose (56%), quantidades médias de xilose (13%) e glicose proveniente de celulose (12%) e pequenas de AU (7%), galactose (6%), ramnose (2%) e glicose (3%). Quantidades mínimas de fucose (0,8%) e manose (0,5%), também foram encontradas (Figura 14). A glicose que não se encontra relacionada com a celulose e provém, quase que exclusivamente, dos xiloglicanos.

Ao contrário da casca, a composição de açúcares dos polímeros solúveis e insolúveis em água, provenientes da parede celular do cotilédone de feijão, não se assemelharam com o de outras leguminosas encontradas na literatura. Comparada à parede celular de tremoço (EVANS & CHEUNG, 1993), verificou-se que o feijão possui cerca de 4 vezes mais arabinose, tanto nas frações solúveis quanto insolúveis (42 e 56% contra 11 e 15%, respectivamente). O conteúdo de galactose em tremoço é 6 a 10 vezes superior ao de feijão (66 e 63% contra 11 e 6% em feijão). Em relação à parede celular de ervilhas (TALBOTT & RAY, 1992), o feijão possui menor quantidade de AU, porém, maior de xilose e arabinose. Os dados de ervilhas obtidos por BHATTY (1990) apresentaram mais semelhanças com os de feijão Pérola. A diferença entre os dados

obtidos é explicável, visto que Bhatti trabalhou com cotilédones de ervilha e Talbott e Ray com internodo.

Comparado aos resultados obtidos por Gooneratne *et al.* (1994^a) com *Vigna radiata* e *Vigna mungo*, nota-se que o conteúdo de arabinose na parede de feijão é cerca de 20% maior. A composição da parede celular de *Vigna radiata* obtida por Gooneratne *et al.* (1994^b) exibiu valores de glicose superiores ao encontrado em feijão, embora a proporção dos demais açúcares tenha se apresentado próximo ao encontrado neste trabalho. A predominância de arabinose, os baixos conteúdos de xilose e galactose e mínimos de ramnose e fucose pareceram ser o ponto comum entre a parede celular de outras leguminosas e a de feijão. Verificou-se, também, que a composição de monossacarídeos da parede celular de feijão Pérola era semelhante à encontrada por Champ *et al.* (1986) e Srisuma *et al.* (1991) em feijão e em lentilha (BHATTY 1990).

6.3.1 Polissacarídeos da FSA do cotilédone

Os polímeros da FSA foram separados através de cromatografia de troca aniônica (grupo ligante formado por amônio quaternário), produzindo pelo menos três picos distintos:

Os polissacarídeos contidos no primeiro pico (P1) eram formados predominantemente por açúcares neutros (Tabela 3). O segundo pico (P2) possuía teores elevados de ácidos urônicos (AU) e açúcares neutros e o terceiro pico (P3) continha, principalmente, AU. O perfil de eluição das frações pécticas de feijão assemelhou-se muito ao apresentado por ervilha (TALBOTT & RAY, 1992) e soja (HUISMAN *et al.*, 2000).

A análise de monossacarídeos revelou que os polímeros em P1 são ricos em manose (30%), arabinose (18%), galactose (14%) e glicose (17,5%), mostrando a predominância de polissacarídeos pécticos neutros, provavelmente, galactanos e arabinanos. Esta fração também continha 12% de xilose, o que pode indicar a presença de xiloglicanos (Tabela 3). Pequenas quantidades de AU (4%) sugerem fragmentos de galacturonanos ácidos.

Tabela 3: Composição de açúcares e polissacarídeos dos polímeros contidos na fração solúvel em água (FSA) da parede celular do cotilédono de feijão.

Fração	Rendimento (%)	Açúcares Neutros (%)							AU (%)
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	
FSA	6,2	1,8	0,6	42,1	11,2	13,3	11,1	7,1	12,7
<i>Fracionamento da FSA</i>									
P1	13,5	0,7	3,4	18,0	11,5	30,1	14,4	17,5	4,4
P2	30,0	1,9	0,2	58,7	9,4	0,8	11,4	1,7	16,0
P3	56,5	1,5	0,5	34,2	8,3	9,9	10,3	9,3	25,9

FSA, fração solúvel em água; **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose; AU, ácidos urônicos; **P1**, **P2** e **P3**, polissacarídeos obtidos respectivamente nos picos 1, 2 e 3 mediante separação por cromatografia de troca aniônica. Composição dada em porcentagem relativa p/p. (n=3)

Os polímeros encontrados em P2 eram compostos por 59% de arabinose, 16% de AU, 11% de galactose, 9% de xilose e apenas 1,7% de glicose (Tabela 3). A quantidade de xilose é alta em relação à de glicose, sugerindo muito mais a presença de xilanos ou, mais provavelmente, xilogalacturonanos (XGA) do que de xiloglicanos (XG). A presença de xilanos, bem como de XGA também foi reportada na parede celular de ervilha, *Vigna* e *Phaseolus coccineus* (TALBOTT & RAY, 1992; RYDEN & SELVENDRAN, 1990; GOONERATNE *et al.*, 1994^{a,b}).

Aparentemente, P3 continha uma mistura de pectinas e hemicelulose, composta por 26% de AU, 34% de arabinose, 10% de galactose e manose, 9% de glicose e 8% de xilose. Devido à grande quantidade de AU, presume-se que esta fração apresente, principalmente, homogalacturonanos (HG) com baixo grau de metilesterificação, visto que estes são eluídos apenas com alta molaridade de NaCl, indicando a presença de grupamentos carboxíla ionizados.

6.3.2 Polissacarídeos da FIA do cotilédono

A literatura indica que os polímeros da FSA possuem elevado grau de metilesterificação, sendo solúveis em água ao passo que, os solúveis em CDTA, por se apresentarem coordenados com íons Ca^{2+} , possuem baixo grau de metilesterificação (SELVENDRAN & O'NEILL, 1987). As bases fracas liberariam polissacarídeos comprometidos com ligações éster e as bases fortes polímeros ligados por pontes de

hidrogênio e ligações éster, como no caso das hemiceluloses (SELVENDRAN & O'NEILL, 1987; FRY, 1986; LOZOVAYA *et al.*; 1999).

Quase metade da FIA (49%) foi solubilizada com NaOH 4M. A segunda maior fração, formada pelo resíduo rico em celulose, representou 21% dos polímeros do FIA. As frações solúveis em base fraca responderam, em conjunto, por 19%. Apenas 11% de material foi solubilizado com CDTA (Tabela 3). Gooneratne *et al.* (1994^b), também observaram que pouco material é extraído da parede celular de *Vigna radiata* com solução quelante de CDTA (5%). Isto comprova que há pouca quantidade de material comprometido com a formação de pectato de cálcio.

Outro ponto comum é a grande quantidade de material extraído com solução de base 4M, que em *Vigna* correspondeu a 35%, muito próximo ao de feijão (Tabela 4). Ainda em *Vigna*, o conteúdo de material extraído com base fraca é de 8,5%. Comparando as três frações, (polímeros extraídos com base a 4M, base fraca e CDTA) verifica-se a proporção de 35:9:5 em *Vigna*, ao passo que em feijões é de 25:10:5, muito próximo ao reportado na literatura. O resíduo rico em celulose também é elevado em amostras de *Vigna* (37%) quando comparado ao de feijão (21%).

Tabela 4: Composição de açúcares e polissacarídeos dos polímeros contidos na fração insolúvel em água (FIA) da parede celular do cotilédono de feijão.

Fração	Rendimento (%)	Cel (%)	Açúcares Neutros (%)							AU (%)
			Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	
FIA	10,9	11,5	2,4	0,8	56,4	12,9	0,5	5,5	3,4	6,6
<i>Fractionamento do FIA</i>										
FCDTA	11,0	-	3,4	0,4	63,8	9,2	0,0	5,9	2,0	15,2
H0,01	6,8	-	4,12	0,3	52,7	13,5	3,7	3,0	1,1	21,6
H0,5	6,5	-	3,6	0,6	54,3	13,8	1,4	5,7	3,9	16,7
H1	5,7	-	3,1	1,1	54,2	14,4	0,4	6,6	8,6	11,6
H4	49,1	-	2,9	0,8	57,9	11,9	1,0	6,1	9,8	9,5
Resíduo	20,9	-	0,0	0,0	11,3	0,4	17,7	0,0	56,2	14,4

FIA, material celular; **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose; **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; **FCDTA**, fração solúvel em solução quelante de CDTA, **H0,01-H4**, frações solúveis em NaOH 0,01-4M; **Resíduo**, resíduo rico em celulose. Composição dada em porcentagem relativa p/p. (n=3)

6.3.3 Perfil de monossacarídeos

A análise dos polissacarídeos obtidos da FIA revelou a presença de grande quantidade de arabinose (53-64%), AU (10-22%) e galactose (3-7%) (Tabela 3). O feijão e outras leguminosas reportados na literatura possuem polissacarídeos de parede celular ricos em arabinose, com valores em torno de 40-60% (CHAMP *et al.*, 1986; SRISUMA *et al.*, 1991; BHATTY, 1990; RYDEN & SELVENDRAN, 1990; TALBOT & RAY, 1992). Os resultados obtidos com parede celular de feijão Carioca-Pérola está, portanto, muito próximo ao obtido da literatura (Tabela 3). Sua composição aponta para uma estrutura rica em arabinanos e arabinogalactanos. A grande quantidade de arabinose em relação à de galactose indica que há predominância de arabinanos.

O conteúdo baixo de ramnose (3-4%) sugere que os ramnogalacturonanos estão presentes, porém, em quantidades mínimas. Isto também pode significar que as pectinas ácidas presentes em feijão possuem poucos pontos de ramificação, considerando-se que as cadeias laterais do ramnogalacturonanos se ligam ao C-4 da ramnose. A grande quantidade de AU em relação à ramnose, pressupõe a existência de cadeias longas de homogalacturonanos, espaçadas com poucos domínios de ramnogalacturonanos. Ryden e Selvendran (1990) também observaram baixo conteúdo de ramnose associado a grande quantidade de arabinose na parede celular de *Phaseolus coccineus*, da mesma forma que Gooneratne *et al.* (1994^b) em *Vigna radiata* e Stolle-Smits *et al.* (1995) em feijões verdes.

Pequenas quantidades de xilose (9-14%), glicose (1-10%) e fucose (0,3-1%) sugerem baixo conteúdo de xiloglicanos (Tabela 3). A literatura descreve a estrutura de parede celular de *Phaseolus coccineus* e *Vigna radiata* como sendo formada por pequenas quantidades de xiloglicanos e xilanos (RYDEN & SELVENDRAN, 1990; GOONERATNE *et al.*, 1994^b). É provável que este padrão também se repita em *Phaseolus vulgaris*.

Mais da metade do resíduo rico em celulose é constituído por glicose (56%), a maior parte provém da celulose. A presença nesta fração de arabinose (11%), AU (14%), manose (18%) e xilose (0,4%) indica forte interação dos componentes pécicos e hemicelulósicos com as microfibrilas de celulose (Tabela 3).

Com exceção do resíduo que contém grande quantidade de glicose, todas as demais frações estudadas parecem possuir a mesma composição de monossacarídeos, rica em arabinose e AU (Tabela 3). A princípio, este padrão pode sugerir que os polissacarídeos extraídos com o auxílio de diferentes solventes possuem estruturas químicas semelhantes, mostrando diferenças apenas na natureza das ligações interpoliméricas que lhes conferem estabilidade. Embora isto pareça factível, deve-se levar em consideração que um monossacarídeo específico pode entrar na composição de diferentes polissacarídeos. Dessa forma, a confirmação da estrutura e da composição dos mesmos só é obtida após a análise das ligações glicosídicas mediante a conversão dos polímero metilados em monossacarídeos parcialmente metilados.

6.3.4 Perfil de pesos moleculares das frações polissacarídicas.

O perfil de eluição dos polímeros da parede celular de feijão apresenta baixo grau de dispersão, compreendendo valores em torno de 1.500-3.500 kDa. Os valores mais elevados são observados nos polímeros extraídos com CDTA (3.505 kDa) e NaOH 0,01; 0,5 e 1M (PM_(s) em torno de 2.987 kDa). Os polímeros solúveis em NaOH 4M (H4), apresentam o menor PM (1.577 kDa), ao passo que os polímeros solúveis em água (FSA) possuem tamanho intermediário (PM $\approx$ 2.170 kDa).

O trabalho de Talbott e Ray (1992) com ervilhas, mostra que a formação de agregados de PM elevado (3.000 kDa) ocorre quando as amostras são concentradas. Segundo os autores, os polissacarídeos da parede celular de ervilhas apresentam PM em torno de 1.100 kDa. Aparentemente, quando as amostras são concentradas, ocorre interação entre as moléculas de pectina com a formação de agregados de alto peso molecular. Este artefato da técnica causaria, portanto, a superestimação dos valores de PM.

Como os polímeros neste trabalho foram dialisados e posteriormente liofilizados, supõe-se que houve a formação dos agregados, o que justifica o elevado peso molecular mostrado pelas pectinas de feijão. Não se sabe, porém, a natureza das interações envolvidas na formação dos agregados, visto que, estas são extremamente estáveis e uma vez formadas, dificilmente se desfazem; mesmo sob elevadas concentrações de hidróxido (1M). O entrelaçamento das cadeias poliméricas com a

formação de emaranhados de difícil solubilização poderia explicar em parte este fenômeno e, neste caso, a interação seria puramente física. Outro aspecto importante, é que, raramente observou-se a presença de mais do que um único pico em cada corrida, mesmo em amostras com pesos moleculares menores que eluíram distante do volume morto da coluna.

De maneira oposta, os polímeros presentes na fração H4, foram facilmente solubilizados no eluente, composto por solução de NaOH 0,5M. É provável que a solubilização tenha ocorrido devido à quebra de ligações éster. Os dados indicam que os polímeros desta fração podem ser formados por polissacarídeos ramificados com estrutura globular e unidas por ligação éster ou, por moléculas mais lineares com pouca ramificação e unidas por pontes de H.

6.3.5 Perfil de ligações

6.3.5.1 Polissacarídeos do cotilédone

De acordo com a literatura, a parede celular primária é constituída por polímeros que são, essencialmente, arabinanos puros, constituídos por uma cadeia principal formada por arabinose 5-ligada, podendo apresentar ramificações na posição C-2 e C-3 da arabinose (MCNEIL *et al.*, 1984; CARPITA & GIBEAUT, 1993; BRETT & WALDRON, 1996). As frações polissacarídicas analisadas mostraram presença de grande quantidade de arabinose 5-ligada (24-34%), terminal (24-30%), 2,5 e 3,5 ligadas (3-7% e 5-7%, respectivamente) (Tabela 4). Os dados sugerem a presença de arabinanos ramificados nas posições C-2 e C-3. O perfil de ligações encontrado em feijão é semelhante ao obtido por Gooneratne *et al.* (1994^b) em *Vigna radiata* e por Ryden e Selvendran (1990) em *Phaseolus coccineus*.

Como foi observado, de toda a arabinose presente, 24-30% são terminais, 24-34% estão 5-ligadas e 10-14% possuem ramificação. Cerca de 6-10% encontra-se penta-acetilada, provavelmente, devido ao impedimento estérico durante a reação de metilação (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de ligações dos polissacarídeos das fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) do cotilédono de feijões controle.

Polissacarídeo relacionado	Monômeros	FSA	TI ^{P2}	FCDTA	FBF	H4
		% Molar				
Arabinanos	<i>t-araf</i>	24,82	29,59	28,81	23,51	28,43
	5- <i>araf</i>	25,99	34,40	32,39	29,93	23,56
	3,5- <i>araf</i>	6,36	7,33	6,84	6,47	4,77
	2,5- <i>araf</i>	2,66	5,46	6,81	6,47	4,87
	arapentaOAc	7,37	8,87	9,13	9,64	6,37
Xiloglicanos Xilanos XGA	<i>t-glcp</i>	1,90	-	1,56	1,54	2,49
	4- <i>glcp</i>	0,95	0,99	0,60	1,62	2,01
	4,6- <i>glcp</i>	2,14	-	1,07	2,15	4,78
	<i>t-xilp</i>	9,41	6,51	6,67	11,49	13,26
	2- <i>xilp</i> +4- <i>xilp</i>	1,34	0,84	0,74	1,69	2,90
	<i>t-fuc</i>	0,51	-	0,19	0,15	0,78
	<i>t-galp</i>	2,02	1,33	1,60	1,71	2,78
	2- <i>galp</i>	1,05	-	0,22	0,69	0,97
	3- <i>galp</i>	0,57	0,52	0,50	0,04	-
	4- <i>galp</i>	0,08	0,52	0,06	0,07	-
Galactanos AGII RGI	6- <i>galp</i>	0,39	0,81	0,40	0,35	0,11
	3,6- <i>galp</i>	1,42	-	-	-	-
	4,6- <i>galp</i>	0,92	1,19	0,89	0,80	0,74
	2- <i>ram</i>	0,77	0,96	0,86	1,16	0,83
	2,4- <i>ram</i>	0,63	0,69	0,67	0,52	0,33
-	<i>t-manp</i>	5,82	-	-	-	-
	2- <i>manp</i> +2- <i>glcp</i>	2,17	-	-	-	-
	2,6- <i>manp</i>	0,71	-	-	-	-

A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa. **TI^{P2}**, pico 2 obtido por cromatografia de troca aniônica dos polímeros da FSA; **FBF**, frações solúveis em base fraca que correspondente à soma das frações H0,01; H0,5 e H1; **FCDTA**, fração solúvel em solução de quelante de CDTA; **H4**, fração solúvel em NaOH 4M. Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo C-1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose; (n = 3).

O'Neill e Selvendran (1980) também notaram quantidade elevada de *t-araf* na parede celular das vagens de feijão. De acordo com os autores, isto significa que os arabinanos são ramificados, porém de baixo peso molecular, possuindo cadeias com no máximo 3 resíduos de arabinose. Entretanto, analisando o perfil peso molecular de feijões Carioca-Pérola, observa-se que os polímeros da parede celular do cotilédono possuem pesos moleculares elevados, entre 1.500-3.500 kDa (item 5.3). Além disso, a eluição da FCDTA em coluna de exclusão molecular produz dois picos; o primeiro com peso molecular elevado, contendo apenas açúcares neutros e o segundo, contendo pectinas ácidas com peso molecular mais baixo (anexo). Isto indica que, pelo menos na FCDTA, os polissacarídeos compostos por açúcares

neutros (a maior parte arabinanos) são moléculas independentes e grandes. Assim, a maior parte dos arabinanos parecem estar livres, ao passo que, estruturas de menor tamanho encontram-se ligados ao RG, compondo cadeias laterais. Os arabinanos podem formar interações do tipo ponte de H, semelhante ao que ocorre nas porções lineares de xiloglicanos com a celulose (OOSTERVELD *et al.*, 1996). Outra observação importante, é que o tratamento com EPG não causa muita variação no perfil de PM que passou a ter valores entre 4.000 e 400 kDa (dados não apresentados).

Parte da galactose encontrada era 3,6-ligada (traços-1,4%) e 6-ligada (0,1-0,8%), o que sugere a presença de arabinogalactanos tipo II (AGII), cuja estrutura é composta por (1→3) e (1→6)β-D-galactanos, com a maioria dos oxigênios dos carbonos 3 e 6 substituídos por unidades *t*-arabinosil (Carpita & Gibeaut, 1993). Parte da arabinose terminal é, portanto, proveniente de ramificações da molécula de AGII e a grande maioria provém de ramificações de arabinanos. Embora o feijão possua 4-galp (0,1-1%), a ausência de galactose 3,4-ligada descarta a existência de AGI na parede celular de feijão (Tabela 4). Talbott e Ray (1992) também notaram a falta do ponto de ramificação da galactose (C-3) em polissacarídeos provenientes da parede celular de ervilha. Concluíram, da mesma forma reportada por Gooneratne *et al.* (1994^b) e Ryden e Selvendran (1990), que os resíduos de galactose 4-ligada são provenientes de galactanos. A parede celular de feijão também mostra evidências de que é composta por grande quantidade de arabinanos e pequena quantidade de AGII e galactanos. Entretanto, não há como afirmar categoricamente se possui AG(s) e galactanos ou somente um dos componentes.

A ramnose 2-ligada (0,8-1,2%), sugere a existência de ramnogalacturonanos. A presença de ramnose 2,4-ligada (0,3-0,8%) pressupõe pontos de ramificação na cadeia principal. Segundo a literatura, cadeias laterais constituídas por galactanos e arabinanos podem estar ligadas ao C-4 da ramnose (GIBEAUT & CARPITA, 1993; BRETT & WALDRON, 1996; CARPITA & MCCANN, 2000). A baixa quantidade de ramnose sugere poucos domínios de RG em relação aos domínios de HGA(s) nas pectinas ácidas. O mesmo padrão também é observado em parede celular de ervilhas (Talbott & Ray, 1992). As regiões de RG encontradas nas pectinas de feijão são semelhantes ao modelo descrito no trabalho de Ridley *et al.* (2001). Este domínio da molécula é formado por uma cadeia principal contendo unidades repetitivas de [→4-α-DGalp-(1→2)-α-L-

Ramp-(1→], onde ramificações formadas por galactanos e arabinanos aparecem ligadas ao C-4 da ramnose (Figura 18).

Com exceção dos polímeros isolados por cromatografia de troca iônica (P2), todas as frações continham xilose terminal (7-13%), galactose 2-ligada (traços-1%), glicose 4-ligada (0,6-2%) e 4,6-ligada (traços-5%). Quantidades mínimas de fucose terminal também foram encontradas (traços-0,8%). Conclui-se, portanto, que o xiloglicano é a principal hemicelulose encontrada na parede celular do cotilédone de feijão, embora sua quantidade seja muito baixa.

Todas as frações contém grande quantidade de xilose terminal (7-13%) em relação à glicose 4 e 4-6-ligada (1-8%), o que sugere que parte dos monômeros não são provenientes de XG. O tratamento com celulase e EPG promove a separação entre hemicelulose e pectina e confirma a suposição, visto que grande parte da xilose terminal (*t*-xilp) fica retida nas frações pécicas.

Figura 18: Modelo apresentando os principais componentes do RGI. A cadeia principal, composta por unidades repetitivas de $[\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-DGalp}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp}(1\rightarrow)]$. Oligossacarídeos lineares e ramificados, formados por $\alpha\text{-L-Araf}$ e resíduos de $\beta\text{-D-Galp}$ estão ligados ao C-4 de alguns resíduos de Ramp, que também podem estar O-acetilados no C-2 e / ou C-3. Figura retirada de RIDLEY *et al.* (2001). HG, homogalacturonano, continuidade da molécula.

Sabe-se que há uma classe separada de HGA que possui metade de seus resíduos substituídos com unidades de $\alpha\text{-D}$ -xilose na posição 3 (CARPITA & MCCANN, 2000). Embora o fato não tenha sido confirmado, estes polissacarídeos denominados xilogalacturonanos (XGA), podem estar presentes na parede celular de feijão.

Gooneratne *et al.* (1994b) também encontraram evidências preliminares da existência de XGA na parede celular de *Vigna radiata*. As análises de Gooneratne *et al.* (1994b), demonstraram a presença de resíduos galacturonosil 3,4-ligados e grande quantidade de *t*-xilp associada a material pécico. Além disso, estudos com polissacarídeos da parede celular obtidos de vagens de *Phaseolus coccineus* também mostraram evidências preliminares da existência de xilose ligada à posição C-3 de resíduos de galactopiranouronil 1,4-ligados (RYDEN & SELVENDRAN, 1990). Corroborando estas observações, verificou-se que ao tratar enzimaticamente as frações polissacarídicas de feijão Carioca-Pérola, houve a separação entre os componentes pécicos e hemicelulósicos. Nas frações contendo material pécico, onde quase não havia glicose 4,6-ligada, foi encontrada grande quantidade de xilose terminal. Este fato reforça a suposição de que a parede celular do cotilédone de feijão pode conter XGA.

A análise de ligação da parede celular de feijão também revelou presença de xilose 4-ligada, provavelmente proveniente de xilanos que são polímeros de xilose β 1,4-ligados, contendo ramificações de arabinose substituídos em C-2 ou C-3. A presença de xilanos também foi reportada em *Vigna radiata*, *Phaseolus coccineus* e ervilha (RYDEN & SELVENDRAN, 1990; GOONERATNE & col., 1994a, b; TALBOTT & RAY, 1992). Ryden e Selvendran (1990) sugeriram que a presença de xilanos em parede celular não lignificada de cotilédone de *Phaseolus coccineus* poderia significar um prenúncio de lignificação. É interessante verificar que, embora a quantidade de xilose 4-ligada seja bastante baixa no cotilédone, está presente em todas as frações analisadas.

A Figura 19 traz a representação gráfica de alguns dos componentes que presumivelmente estão presentes na parede celular do cotilédone de feijão. Em resumo, as evidências indicam que as pectinas da parede celular de feijão são formadas por RG(s) ramificados, com regiões se metil-esterificadas e porções desesterificas coordenadas com cálcio (Figura 19). Pequenas quantidades de xiloglicanos ligados à celulose também aparecem representados, bem como XGA e as ramificações de galactanos e arabinanos. O modelo foi adaptado do trabalho de McDougall e Selvendran (2001).

Figura 19: Figura representativa mostrando alguns dos polissacarídeos presentes na parede celular feijão. No alto, a estrutura da pectina, composta por polissacarídeos ácidos com ramificações formadas por polissacarídeos neutros e embaixo, a estrutura da celulose, recoberta por xiloglicanos (XG), mergulhada na matriz pectica. RG, ramnogalacturonano; XGA, xilogalacturonano. τ MeOH esterificado à pectina. Fonte, Mc Dougall & Selvendran (2001).

6.4 Efeitos do armazenamento e da cocção sobre os nutrientes.

Após armazenamento a $35^{\circ}\text{C}/75\%$ UR durante período de 8 meses, o tempo de cocção das sementes aumentou 4,7 vezes o valor original, revelando o desenvolvimento do HTC (Tabela 6).

Tabela 6: Tempo de cocção de feijões novos e envelhecidos.

	<i>Novo</i>	<i>Envelhecido</i> <i>35 °C/75% UR</i>
<i>Tempo de cocção</i> <i>(min)</i> (n = 4)	33,39 ± 1,19	155,75 ± 6,13

A avaliação do valor nutricional foi realizada em amostras cozidas, visto ser a forma em que as sementes normalmente são consumidas. A influência do HTC foi avaliada levando mais em consideração as amostras cruas.

De acordo com a literatura, o desenvolvimento do HTC provoca perda da qualidade nutricional das sementes (REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993; SABARENSE *et al.*, 1995). Ao comparar as amostras cozidas, observa-se que com o desenvolvimento do HTC não houve variação na composição de proteína, minerais e fibra solúvel, contudo o conteúdo de lípidos reduz 60% e o de fibra insolúvel 5%.

Analisando os efeitos da cocção sobre a qualidade nutricional em feijões normais, nota-se que após o tratamento hidrotérmico o conteúdo de fibra solúvel aumenta 32%, ao passo que o de fibra insolúvel reduz em 13% (Tabela 7)

Tabela 7: Comparação entre as composição centesimal de amostras cruas e cozidas de feijão Carioca-Pérola. Valores de umidade, proteína, cinzas, lípidos e fibra na casca e cotilédono em amostras envelhecidas e controle, em peso seco.

Amostra	Proteína	Cinzas	Lípides	Total	Fibra (%)		
	(%)				Solúvel	Insolúvel	Total
Cotilédone							
Cru novo	23,91±0,58 ^a	4,78±0,05 ^{ad}	1,96±0,06 ^a	30,6	3,87±0,13 ^a	19,03±0,25 ^a	22,9
Cru duro	22,20±0,10 ^b	4,06±0,17 ^{bc}	1,96±0,11 ^a	28,2	1,38±0,02 ^b	16,24±0,39 ^{bc}	17,6
Cozido novo	25,00±0,19 ^c	3,93±0,02 ^{bc}	1,96±0,42 ^a	30,9	5,65±0,21 ^c	16,61±0,23 ^b	22,3
Cozido duro	24,62±0,30 ^c	4,97±1,02 ^{cd}	0,82±0,48 ^b	30,4	5,07±0,41 ^c	15,71±0,34 ^c	20,8
Casca							
Cru novo	9,19±0,08 ^a	5,10±0,20 ^a	0,6±0,08 ^a	14,9	4,09±0,95 ^a	66,96±0,50 ^a	71,1
Cru duro	9,34±0,32 ^a	5,22±0,12 ^a	0,75±0,09 ^a	15,3	5,24±1,13 ^a	68,62±0,80 ^b	73,9

Médias na mesma coluna e no mesmo grupo de dados, seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes (n=3)

Em amostras cruas, o desenvolvimento do HTC causou apenas ligeira redução no conteúdo de proteína e cinzas (Tabela 7). Comparando as amostras cruas, verifica-se que o teor de fibra solúvel na amostra envelhecida é menos da metade do controle e

valor de fibra insolúvel sofre aumento em 15%. Nas cascas, o conteúdo de fibra solúvel aumentou 22% e o de fibra insolúvel apenas 2%.

Não foi encontrado um padrão muito definido de comportamento que se possa relacionar com o desenvolvimento do HTC. A Tabela 7 deixa claro que a cocção promove aumento no conteúdo de fibras solúveis mas, apesar da queda no conteúdo de fibra solúvel ser esperada, a redução fibra insolúvel foi totalmente inusitado, principalmente considerando-se o baixo coeficiente de variação (< 5). Os dados da Tabela 7 parecem indicar mudanças aleatórias e não um padrão definido de comportamento. Porém, deve-se considerar que a qualidade nutricional não está associada somente à composição mas também à biodisponibilidade de seus nutrientes *in vivo*. Embora as alterações tenham sido pequenas, a literatura mostra que com o desenvolvimento do HTC há perda de qualidade nutricional, como pode ser observado pela redução na disponibilidade das proteínas em sementes defectivas (Sabarense et al., 1995; Aguilera & Rivera, 1992; Reyes-Moreno & Paredes-López, 1993). Entretanto, no presente trabalho não foi estudada a digestibilidade dos nutrientes em feijões HTC.

6.5 Efeitos da cocção e do envelhecimento na estrutura polimérica da parede celular do cotilédono.

Em amostras normais cozidas a recuperação de FIA foi especialmente baixa, cerca de 32% menor do que a obtida em amostras cruas. O cozimento não causou mudança considerável na recuperação de FSA, que permaneceu em torno de 6% (Figura 20). Os dados indicam que em feijões normais há perda de FIA com o cozimento, o mesmo não ocorrendo em sementes HTC, que mantém o rendimento em torno de 13% (Figura 20). Mesmo comparando entre amostras cruas, verifica-se que feijões envelhecidos possuem 18% a mais de FIA e 34% menos polímeros solúveis em água (FSA).

Resumindo, a cocção causou perda de material pécico insolúvel e solúvel em água em amostras normais, porém em feijões HTC essa perda é bastante reduzida, havendo apenas aumento na FSA. Ao que parece, a despolimerização dos polissacarídeos de parede celular insolúvel em água (FIA) durante a cocção é menor em feijões HTC. Como a maior parte do FIA é composto por polissacarídeos provenientes da parede primária, isto pode significar maior participação do que o esperado desta estrutura no processo de abrandamento dos tecidos por cocção. Este fato também foi

verificado por Shomer *et al.* (1990) que perceberam que em amostras de feijões normais os polissacarídeos da parede celular primária perdem a estrutura reticular quando submetidos à cocção. Entretanto, em feijões HTC as pectinas não sofrem desestruturação com o cozimento e a estrutura reticular da parede primária permanece inalterada, semelhante ao apresentado por amostras cruas. Isto demonstra que em feijões HTC os polímeros não sofrem desestruturação com o cozimento.

Figura 20: Rendimento de fração insolúvel em água (FIA) e da fração rica polissacarídeos solúveis em água (FSA), obtido mediante a extração enzimático-química da farinha obtida do cotilédono de feijões controle e armazenados a 35°C/75% UR, crus e cozidos, (n ≥ 3).

Em feijões Carioca-Pérola os polímeros da parede celular de sementes HTC são menos propensos à despolimerização em relação às amostras normais. Em amostras cozidas, verifica-se que os feijões HTC apresentam recuperação de FIA significativamente superior (42%) em relação aos feijões normais, embora o seu rendimento de FSA tenha permanecido inalterado (Figura 20). Os resultados demonstram que a cocção causa perda substancial de material péptico em feijões normais, contudo, em sementes HTC isto não ocorre (Figura 20). Mesmo submetidas a longos períodos de cocção, as sementes endurecidas não apresentaram hidrólise nem solubilização acentuada de seus polissacarídeos.

A diferença no grau de hidrólise dos polissacarídeos por cocção, também foi observada por Moscoso *et al.* (1984). Neste trabalho, a perda de material péptico (conteúdo de AGal) das frações polissacarídicas solúveis e insolúveis em água, da casca e do cotilédono, foram monitoradas durante o armazenamento. Moscoso *et al.*

observaram que em sementes envelhecidas, a perda de substâncias pécicas com o cozimento era substancialmente menor. A redução na hidrólise de polissacarídeos foi observada tanto nas frações solúveis, quanto nas insolúveis em água da casca e do cotilédone de feijão. Também foi verificado, que a perda de material pécico com a cocção obedecia a uma cinética de primeira ordem, produzindo gráficos com curvas retilíneas.

Outros trabalhos também reportam a perda de solubilidade dos polímeros pécicos com o desenvolvimento do HTC (JONES & BOULTER, 1983; MOSCOSO *et al.*, 1984; SHOMER *et al.*, 1990; MAFULEKA *et al.*, 1993). A perda de solubilidade dos polímeros de parede pode estar relacionada com a formação de pectatos insolúveis, redução da β -eliminação ou, insolubilização devido à formação de outros tipos de ligações. Um exemplo seria o aumento das interações do tipo ponte de H ou formação de diferulatos e de isoditrosina. O comprometimento dos compostos fenólicos no processo de endurecimento de feijão foi estudado por Garcia *et al.* (1998), onde se verifica que em feijões HTC o conteúdo de fenólicos ligados é maior.

A literatura tem demonstrado a presença de ácidos ferúlicos esterificados às pectinas (MCNEIL *et al.*, 1984; ISHII, 1997; RIDLEY *et al.*, 2001; CARNACHAN & HARRIS, 2000), estas moléculas podem formar ligações com outros componentes da parede através da ação da peroxidase (FRY, 1983; FRY, 1986; BRETT & WALDRON, 1996; ISHII, 1997). Uma das teorias associadas ao HTC relaciona o envolvimento de compostos fenólicos com um mecanismo semelhante à lignificação (VARRIANO-MARSTON & JACKSON, 1981; HINCKS & STANLEY, 1987; MAFULEKA *et al.*, 1993). Entretanto, poucas dicotiledôneas possuem grande quantidade de dímeros de ácido ferúlico, salvo algumas exceções, como a beterraba (*Beta vulgaris*) e o espinafre (*Spinacia oleracea* L.), que possuem quantidades expressivas deste componente esterificados às pectinas (MCNEIL *et al.*, 1984; FRY, 1983; CARNACHAN & HARRIS, 2000).

6.6 Efeitos da cocção e do envelhecimento na estrutura polimérica da parede celular da casca.

Foram observadas pequenas alterações na solubilidade dos polissacarídeos das cascas. Com o envelhecimento das sementes, a fração insolúvel, representada pela massa de FIA, sofre acréscimo em 6%. Também foi verificada a redução em 1% no rendimento da FSA (Figura 21).

Os dados demonstram que, ao contrário do que é apregoado na maioria dos trabalhos sobre HTC, a casca também contribui com o endurecimento das sementes. Aparentemente, o problema não se restringe apenas aos cotilédones.

Figura 21: Rendimento de fração insolúvel em água (FIA) e da fração rica polissacarídeos solúveis em água (FSA), obtido mediante a extração enzimático-química da farinha obtida da casca de feijões controle e armazenados a 35°C/75% UR, (n ≥ 3).

Stanley *et al.* (1989) também estudaram a influência das cascas sobre a textura de feijões e constataram a sua contribuição no aumento da dureza dos grãos em amostras HTC. Segundo os autores, a casca também sofre processo de endurecimento com o armazenamento das sementes. Os autores atribuíram esse endurecimento das cascas a um mecanismo semelhante à lignificação.

A redução no processo de despolimerização dos polissacarídeos pécnicos mediante cocção, ocorre em maior grau no cotilédone e menor na casca e pode estar relacionado às alterações na textura de sementes HTC. Logicamente, se menos quantidade de material péctico da parede primária e lamela média é perdido, a entrada de água na célula é dificultada, comprometendo o processo de gelatinização

do amido e expansão das células, restringindo a separação das células (LIU, 1995; JONES & BOULTER, 1983; SHOMER *et al.*, 1990)

6.7 Alteração na composição de monossacarídeos

6.7.1 Cascas

Os dados da Figura 22, apresentados em μg de açúcar por mg de farinha de cotilédono, indicam que, com o envelhecimento das sementes, houve diminuição da solubilidade dos polissacarídeos de parede celular em água (FSA), resultando em queda na recuperação e nos teores dos açúcares constituintes. A Figura 22 mostra claramente a redução nos valores de arabinose (49%), xilose (44%), AU (32%), galactose (36%) e glicose (22%). Paralelamente, se observa aumentou em 41% no conteúdo de manose.

Figura 22: Composição em carboidratos da fração insolúvel em água (FIA) e da fração solúvel em água (FSA) da casca de feijões novos e envelhecidos. Valores apresentados em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de farinha de casca. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose; **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; **FIA**, material celular; **FSA**, fração solúvel em água, ($n \geq 3$).

A composição de carboidratos do FIA da casca também apresentou alterações significativas com o envelhecimento. Houve incremento no conteúdo de arabinose (3,4%), glicose (27%) e fucose (98%) (Figura 22). Concomitantemente, o conteúdo

de xilose diminuiu 48%, a porcentagem de AU aumentou 30% e a de ramnose triplicou (Figura 22). Também foi verificada a elevação nos valores de celulose em 16% (Figura 22). Aparentemente, o envelhecimento das sementes causou aumento no conteúdo de material péctico na fração insolúvel em água, como pode ser constatado pelo aumento de arabinose, AU e ramnose. Isto teria causado a redução na proporção de xilose, que provavelmente está associada aos xiloglicanos e, principalmente, aos xilanos. É provável que em sementes envelhecidas as pectinas presentes nas cascas sejam menos solúveis em água.

6.7.2 Cotilédone

O envelhecimento causou alterações consideráveis no perfil de monossacarídeos de amostras cruas. A FSA exibiu diminuição nos valores de todos os açúcares constituintes, indicando a perda da solubilidade dos polímeros em amostras envelhecidas. Na figura 23 nota-se a redução nos valores de AU, ramnose e arabinose que sofreram decréscimo em 50, 43 e 45%. Verifica-se, também, redução nos valores de fucose (41%) e xilose (39%), que demonstram o envolvimento das hemiceluloses no processo de perda de solubilidade (Figura 23).

Em relação ao FIA, foi verificada a elevação nos conteúdos de manose e AU em 67% e 18%, respectivamente. Isto indica que quantidades consideráveis de material péctico foram insolubilizados (Figura 23). O conteúdo de arabinose e galactose sofreram decréscimo de 17 e 16%, respectivamente. De forma curiosa, o conteúdo de glicose relativo à celulose apresentou aumento de 56% (Figura 23). Considerando-se que amostras envelhecidas possuem 19% mais FIA e 34% menos FSA, as alterações provocadas pelo HTC são consideradas expressivas.

Resumindo, foi verificado que quantidade apreciável de material perdeu a solubilidade com o desenvolvimento do HTC. A alteração mais marcada é a redução de AU na FSA e o aumento concomitante ocorrido no FIA (Figura 23). Isto pode indicar aumento das interações químicas entre galacturonanos e, também, a perda de esterificação das pectinas metiladas causando comprometimento do mecanismo de β -eliminação.

Figura 23: Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédones de feijões crus e cozidos. Valores apresentados em µg de açúcar por mg de farinha de cotilédones. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose; **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n ≥ 3).

Analisando amostras cozidas, verifica-se que o processamento térmico aumenta a solubilidade das pectinas, entretanto, em sementes envelhecidas, a perda de material péctico do FIA é menor, o que resulta em valores de arabinose, galactose e xilose, 35, 59 e 18% superiores ao encontrado em sementes normais. Isto indica menor susceptibilidade das pectinas e hemiceluloses de feijões HTC à solubilização e despolimerização mediante a cocção (Figura 23). Além disso, verifica-se que em sementes envelhecidas o conteúdo de manose e glicose é 3 e 7 vezes superior ao de amostras novas (Figura 23). Na fração solúvel em água (FSA), verifica-se que a perda causada pela cocção é mínima, e causa a diminuição de AU em 16%, porém, promove o aumento de xilose, galactose e manose em 36, 19 e 18,7%, respectivamente (Figura 23).

6.7.3 Avaliação dos efeitos da cocção sobre feijões normais e HTC

A cocção causa solubilização e perda de material péctico, através da quebra de ligações e despolimerização de seus constituintes. Esta perda é particularmente

acentuada nas sementes novas que sofrem redução de 19% no rendimento de FSA. O perfil de monossacarídeos dos polímeros solúveis em água se altera mostrando decréscimo no conteúdo de manose em 32% e de glicose em 20% (Figura 24). O conteúdo de AU eleva 19% e o de arabinose 6%, mostrando as alterações na composição polimérica (Figura 24).

Em sementes novas, a cocção leva à diminuição no conteúdo de todos os açúcares do FIA, com exceção da glicose proveniente da celulose e da hemicelulose, que apresentam aumento em 81 e 44%, respectivamente (Figura 24). A cocção causa redução nos valores de arabinose (35%), xilose (41%), manose (38%), AU (7%), ramnose e galactose (ambos 33%) e de fucose (31%). Os resultados mostram claramente que sementes novas perdem grande quantidade de material péctico pelo tratamento hidrotérmico. Como a perda se dá em relação aos polissacarídeos do FIA que são insolúveis em água, é provável que tenha havido despolimerização e quebra de ligações nos polímeros da parede primária.

Figura 24: Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédones de feijões novos e envelhecidos. Comparação entre amostras cruas e cozidas. Valores apresentados em µg de açúcar por mg de farinha de cotilédones. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n ≥ 3).

Verificando os dados referentes às sementes envelhecidas, percebe-se que a cocção não causa a perda de material do FIA da mesma forma que o observado em sementes novas (Figura 24). Nota-se, também, que a cocção eleva o conteúdo de polímeros solúveis em água, igualando-o aos valores encontrados em sementes normais (Figura 24). O baixo conteúdo de açúcares em sementes cruas envelhecidas se deve à baixa solubilidade dos polímeros quando estes não são submetidos ao tratamento térmico. A cocção de feijões HTC aumenta o conteúdo de pectinas solúveis em água, porém não se observa a redução destas no FIA.

A elevação no conteúdo de glicose do FIA de feijões HTC deve-se à presença de amido resistente (Figura 24). Com o envelhecimento das sementes a estrutura do amido se altera tornando-a mais propensa a rearranjar-se e adquirir uma conformação cristalina, ficando menos disponível ao ataque enzimático (GARCIA *et al.*, 1994). O processo de cocção e resfriamento favorece a formação de amido resistente ao ataque enzimático, dificultando a sua remoção. Ao excluir esta glicose dos cálculos, verifica-se que a perda de material pécico do FIA de feijões HTC não se altera mediante a cocção. Se não há queda na recuperação de FIA, conclui-se que o processamento térmico prolongado não é suficiente para solubilizar o material pécico de feijões HTC.

Resumindo, a cocção de feijões normais provoca perda de material pécico das frações insolúveis em água, provavelmente devido à despolimerização e solubilização de seus constituintes. A perda de material pécico altera a composição de açúcares, deixando a fração rica em celulose e hemicelulose, como pode ser observado pelo aumento no conteúdo de glicose. O mesmo não ocorre com as amostras HTC, cujas frações polissacarídicas não apresentam queda na recuperação. Portanto, ao contrário dos feijões HTC, as sementes normais perdem grande quantidade de material pécico durante a cocção, principalmente da fração FIA. Como a composição majoritária da FIA é de polímeros provenientes da parede primária, supõe-se que em feijões novos a degradação das pectinas provenientes desta estrutura é acentuada.

Stolle-Smits *et al.* (1995) constataram que durante o processamento térmico, o amaciamento de feijões verdes ocorre com a perda de grande quantidade de material pécico rico em arabinose. A ausência de desestruturação das pectinas da parede primária em feijões HTC observada por Shomer *et al.* (1990) demonstra que esta

estrutura contribui com o defeito textural. As alterações na composição de monossacarídeos e na solubilidade dos polissacarídeos da parede celular de feijão HTC encontram-se resumidas no Quadro 1 e corroboram as observações de Shomer *et al.*

<i>Fração</i>	<i>Rendimento</i>	<i>Amostras cruas</i>	<i>Com a cocção</i>
<i>FSA</i>	↓34%	Redução nos valores de todos os açúcares, principalmente:	Menor perda de açúcares em relação às amostras novas:
		⇒AU (50%)	
		⇒Arabinose (45%)	
		⇒Galactose (33%)	
<i>FIA</i>	↑19%	Aumento o conteúdo de alguns dos componentes:	Menor perda de açúcares em relação às amostras novas.
		⇒Celulose (56%)	Aumento de glicose (12 vezes) em amostras cozidas relacionado à formação de amido resistente.
		⇒AU (18%)	
		⇒Manose (67%)	
		Redução: ⇒Xilose (24%)	O conteúdo de polímeros não reduz com a cocção
		⇒Ramnose (28%)	

Quadro 1: Alterações na composição de monossacarídeos da FSA e FIA em feijões com o envelhecimento e as mudanças provocadas em seu comportamento frente à cocção. **FSA**, fração solúvel em água; **FIA**, fração insolúvel em água

6.7.4 Fracionamento dos polissacarídeos solúveis em água (FSA)

A Figura 25 exibe os perfis de cromatografia de troca aniônica dos polissacarídeos solúveis em água (FSA) de amostras cruas, onde se observa a presença de três picos distintos, dois dos quais, negativamente carregados. O primeiro pico era composto por açúcares neutros, o segundo e o terceiro por açúcares neutros e ácidos. A forte carga negativa apresentada pelos polímeros do terceiro pico, provavelmente se deve à presença de grupamentos COO^- nas pectinas e à carga proveniente da presença de proteína (Figura 25). Os polímeros do pico 3 eram, em parte, formados por polímeros provenientes das enzimas utilizadas no processo de extração da parede celular e embora seu rendimento seja alto, o seu conteúdo de carboidratos é baixo.

Figura 25: Perfil de eluição da FSA de feijões novos e envelhecidos crus em coluna de troca aniônica (Q-Sepharose FastFlow, Pharmacia), eluído com gradiente de NaCl. AU, ácidos urônicos; AT, açúcares totais.

As amostras envelhecidas mostraram redução na dispersão dos polímeros e alteração na relação AU/AT (Figura 25). Em feijões novos, o pico 2 apresentou maior conteúdo de AU em relação à amostra envelhecida. Apesar de haver uma perda aparente no conteúdo de AU na amostra envelhecida, somente os dados de cromatografia em fase gasosa podem confirmar esta observação.

Em amostras envelhecidas cozidas nota-se que há retardamento no tempo de eluição do pico 1 e maior difusão do pico 2 (Figura 26). A eluição dos polímeros pécnicos da FSA revelaram que parte dos polissacarídeos neutros não se encontram ligados aos polissacarídeos ácidos. Os polissacarídeos neutros no pico 2 coeluem com os polissacarídeos ácidos, demonstrando que há ligação entre ambos. O terceiro pico apresentou baixa recuperação de açúcares, embora seu rendimento tenha sido alto após a liofilização, o que demonstra que a fração contém mais do que carboidratos em sua composição, possivelmente, proteínas.

Figura 26: Perfil de eluição da FSA de feijões novos e envelhecidos cozidos em coluna de troca aniônica (Q-Sepharose FastFlow, Pharmacia), eluído com gradiente de NaCl. AU, ácidos urônicos; AT, açúcares totais.

6.7.4.1 Alteração na composição dos polímeros da fração solúvel em água (FSA)

Efeito do envelhecimento sobre os polissacarídeos da FSA

Com o envelhecimento das sementes, houve mudança na composição de açúcares das frações. Em amostras cruas envelhecidas, foi verificado aumento no conteúdo de glicose (67%) e xilose (18%) no pico 1, provavelmente relacionados à hemicelulose. O conteúdo de arabinose manteve-se inalterado, porém, os teores de AU e manose sofreram decréscimo em 100% e 33%, respectivamente (Figura 27^A).

Em relação aos polímeros provenientes dos picos 2 e 3, verifica-se o aumento marcado (56% e 35%) no conteúdo de AU com o envelhecimento das sementes e a queda nos valores de arabinose (17% e 50%)(Figura 27^A). Também foi constatado o aumento no conteúdo de manose no pico 3, que teve seu valor duplicado, indicando aumento de contaminante.

Figura 27: Alteração na composição de açúcares dos polímeros obtidos da fração solúvel em água (FSA) de feijões com o envelhecimento. Valores apresentados em porcentagem relativa. Os polímeros obtidos após a separação em coluna de troca aniônica foram analisados quanto o conteúdo de açúcares. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; (A) Cru; (B) Cozido; (n=3).

O pico 3 concentra grande quantidade de material proveniente das enzimas utilizadas no processo de extração, cuja composição é rica em manose, seu aumento é justificável visto que menos material pécico é extraído da parede celular de sementes envelhecidas, causando elevação proporção de contaminantes da FSA.

Com relação às amostras submetidas à cocção, verifica-se alteração acentuada na composição do pico 1, com aumento nos conteúdos de arabinose (67%) e AU (100%) e redução nos valores de manose (2,2 vezes) e glicose (33%) (Figura 27^B). Os picos 2 e 3 mostraram elevação marcada no conteúdo de AU (3 e 4,3 vezes o valor original, respectivamente). A redução expressiva no conteúdo de açúcares

neutros e o aumento de AU em ambos os picos, demonstra que em sementes envelhecidas as pectinas ácidas são mais abundantes na fração solúvel em água (FSA) (Figura 27^B). O conteúdo elevado de AU nas mostras envelhecidas submetidas à cocção pode revelar perda de polímeros neutros, entretanto, é mais provável que os polímeros ácidos não sofreram hidrólise. Em sementes novas o conteúdo de AU é baixo, demonstrando que o processo de cocção causa perda de pectinas ácidas, muito provavelmente, através de processo de β -eliminação.

Efeito da cocção sobre os polissacarídeos da FSA

Ao analisar os efeitos da cocção sobre os polissacarídeos obtidos de feijões novos, verifica-se que o processamento térmico provoca, principalmente, perda de AU. No pico 1 observa-se redução em 100% no conteúdo de AU. Nos Picos 2 e 3 o decréscimo é de 25 e 73%, respectivamente (Figura 28^A).

Na Figura 28^B, observa-se que em feijões envelhecidos a cocção eleva os valores de AU nos picos 1 e 2 (em 100 e 44%, respectivamente), porém, reduz em 14% no pico 3. Os polímeros do pico 1 mostraram redução nos conteúdos de manose (53%) e glicose (17%) e aumento de arabinose em 2,5 vezes (Figura 28^B), passando, também, a apresentar AU em sua composição. Isto explica o aumento no tempo de retenção comentado no item anterior. É provável que a cocção provoque menos hidrólise das pectinas ácidas em feijões envelhecidos, rompendo algumas ligações glicosídicas e intermoleculares, apenas suficiente para permitir a solubilização dos polímeros provocando a redistribuição dos polímeros nos três picos. Portanto, em amostras envelhecidas a despolimerização dos polissacarídeos ácidos não é acentuada e a cocção prolongada é apenas suficiente para aumentar a solubilidade dos polissacarídeos em água. Os polissacarídeos neutros (arabinanos e galactanos) apresentam boa estabilidade térmica em relação aos poligalacturonanos metilados, que hidrolisam facilmente com a elevação da temperatura. De acordo com a literatura, o envelhecimento das sementes leva à perda da metil-esterificação das pectinas impedindo a reação de β -eliminação (Liu, 1995). A liberação dos grupamentos $-\text{COO}^-$ propicia a formação de pectatos de cálcio, contribuindo ainda mais com a insolubilização das pectinas. Neste caso, menos pectinas ácidas

(Galacturonanos) são perdidos durante cocção, justificando o aumento na quantidade de AU em amostras envelhecidas.

Figura 28: Alteração na composição de açúcares dos polímeros obtidos da fração solúvel em água (FSA) de feijões com o cozimento (amostras normais e envelhecidas). Valores apresentados em porcentagem relativa. Os polímeros obtidos após a separação em coluna de troca aniônica foram analisados quanto o conteúdo de açúcares. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; (A) Novo; (B) Envelhecido; (n=3).

Resumindo, pectinas de feijões HTC são menos susceptíveis à hidrólise por tratamento hidrotérmico, provavelmente, devido à perda de metil-esterificação causada pela ativação da PME. Com o impedimento da reação de β -eliminação, as pectinas ácidas são preservadas e o rompimento de algumas ligações glicosídicas e intermoleculares causaria apenas aumento se sua solubilidade em meio aquoso. Em feijões normais a cocção causa hidrólise de galacturonanos, reduzindo o conteúdo de AU das amostras. Neste caso, em feijões envelhecidos a estrutura polimérica estaria

praticamente intacta e em feijões normais, apenas as porções contendo pectinas neutras estariam presentes. Um exemplo disso, é citado por McDougall e Selvendran (2001), que observaram que métodos de extração agressivos levam à perda de pectinas ácidas por mecanismo de β -eliminação das pectinas metil-esterificadas, com preservação das pectinas neutras (galactanos e arabinanos, principalmente), menos susceptíveis à hidrólise. Assim, o material ficaria rico em pectinas neutras e pobre em galacturonanos ácidos, provocando superestimação do conteúdo de arabinanos na amostra.

A Figura 29 ilustra a estrutura de pectinas ácidas contendo alto grau de metilesterificação e a degradação causada pelo tratamento hidrotérmico, levando à perda das porções ácidas e preservação das porções contendo pectinas neutras.

Figura 29: Representação da hidrólise das pectinas por β -eliminação em amostras normais com produção de oligômeros ácidos formados pelas porções ramificadas de alto peso molecular compostas por polissacarídeos neutros. Preservação das pectinas ácidas, com formação de pectato de Ca^{2+} em amostras envelhecidas τ , metilesterificação no grupamento $-\text{COO}^-$ dos ácidos pectínicos. Adaptado de McDOUGALL & SELVENDRAN (2001).

6.7.5 Efeitos nos polissacarídeos do FIA

Em feijões crus, o envelhecimento causou aumento de rendimento dos polímeros extraídos com hidróxido e do resíduo rico em celulose e ao decréscimo

dos polímeros extraídos com água (FSA) e CDTA (Figura 30^A). Juntas, a FSA e FCDTA respondem por uma redução de 35%. Em amostras cozidas é verificada a mesma tendência, embora a formação de amido resistente eleve em muito o rendimento das frações H0,5 e H1 (Figura 30^A). O amido resistente se forma após a gelatinização do amido e rearranjo de suas moléculas e é solubilizado em NaOH 0,5M e 1M, o que causa a contaminação dos polímeros extraídos nestas concentrações de hidróxido. Em feijões HTC o amido apresenta maior tendências a rearranjar-se em estruturas cristalinas. Mesmo desconsiderando estas frações nos cálculos, ainda assim se observa redução no rendimento dos polímeros extraídos com água e CDTA e o aumento do resíduo e das frações solúveis em álcali concentrado (Figura 30^A e Anexo). Além disso, as frações H0,5 e H1 contribuem pouco na composição da parede.

Portanto, ao contrário do observado no trabalho de Hentges *et al.* (1991), não foi constatado aumento dos polissacarídeos solúveis em CDTA com o envelhecimento das sementes, cujo rendimento sofre decréscimo em 39% em amostras cruas e 16% em amostras cozidas (Figura 30). A redução no rendimento de polissacarídeos pécnicos extraídos por solução quelante também foi observada por Jones e Boulter, (1983).

Analisando os efeitos da cocção sobre sementes normais, verifica-se que há redução no rendimentos de todas as frações, cujas perdas são mais evidentes nas frações H4 (31%), FCDTA (37%) e no resíduo (37%) (Figura 30^B). Neste caso, o tratamento hidrotérmico causar despolimerização e solubilização dos polissacarídeos, principalmente dos extraídos com hidróxido 4M. Em sementes envelhecidas observa-se o aumento de rendimento das frações H5 e H1 devido ao aumento de amido resistente de difícil remoção (Figura 30^B). Excluindo ambas as frações dos cálculos, verifica-se que ocorre decréscimo do rendimento da FSA e FCDTA e aumento das demais frações. No cômputo geral, as sementes envelhecidas apresentam grande quantidade de material insolúvel (amido e polímeros de parede), menos susceptíveis à hidrólise por tratamento hidrotérmico.

Figura 30: Perfil de fracionamento obtido através da extração da fração insolúvel em água (FIA), consecutivamente com CDTA e gradiente de NaOH. O gráfico ilustra o rendimento obtido em relação à de farinha de cotilédono de amostras normais e envelhecidas. **(A)** Efeitos do envelhecimento e **(B)** Efeitos da cocção sobre o perfil de fracionamento; **FSA**, fração solúvel em água; **FCDTA**, fração solúvel em solução de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em hidróxido de sódio 0,01-4,0 M; **Resíduo**, resíduo rico em celulose ($n \geq 4$).

Em resumo, nas sementes normais o material péptico é mais susceptível à hidrólise e seus polímeros são mais solúveis em água e em solução quelante. Além disso, boa parte da fração H4 é solubilizada durante o processo de cocção. Em sementes envelhecidas, menos material péptico é solubilizado e despolimerizado e a propensão à formação de amido resistente é maior.

Segundo o trabalho de Neves (2000), feijões HTC possuem maior quantidade de proteínas ricas em hidroxiprolina nas frações solubilizadas com alcali fraco, implicando em aumento no rendimento destas frações. Em feijões Carioca-Pérola também foi observado aumento das fração solúveis em álcali diluído. Desta forma, conclui-se que o

desenvolvimento do HTC está relacionado com a perda de solubilidade das proteínas e polissacarídeos de parede e com o aumento da cristalinidade do amido.

6.7.6 Efeito do envelhecimento e da cocção sobre o grau de polimerização dos polissacarídeos

Avaliando o perfil de pesos moleculares de amostras cruas, verificou-se que à exceção dos polímeros das frações H1 e H4 que sofrem redução no peso molecular, as demais frações permanecem inalteradas ou apresentam aumento significativo no peso molecular com o envelhecimento (Figura 31). A FSA mostra aumento superior a 1.300 kDa em relação às amostras normais, o que representa um acréscimo de 62%, significando que seus polímeros sofreram menos quebras durante o processo de extração. Os polissacarídeos da fração H0,01 também apresentaram incremento em 518 kDa, ou seja, 17%. Entretanto, os polissacarídeos extraídos da fração H4 e H1 apresentaram redução no peso molecular em 870 e 440 kDa, o que corresponde a um decréscimo de 55 e 15%, respectivamente (Figura 31).

Figura 31: Efeito do envelhecimento sobre o peso molecular das frações. Distribuição de peso molecular das frações pécicas da parede celular de feijão cru obtidas através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose CL4B. **FSA**, fração solúvel em água; **FCDTA**, fração solúvel em solução de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em hidróxido de sódio 0,01; 0,5; 1,0 e 4,0 M; ○ Novo; ◼ Envelhecido.

Em relação às amostras cozidas, verifica-se aumento no peso molecular dos polímeros, exceto da fração H0,5 que sofre decréscimo em 27% (Figura 31). Os polímeros solúveis em água apresentam acréscimo no peso molecular de 17%, em base 4M e CDTA de 38% (Figura 31).

O peso molecular dos polímeros é maior em sementes envelhecidas do que em normais, provavelmente por são menos susceptíveis à despolimerização. É provável que o peso molecular elevado apresentado por amostras envelhecidas esteja relacionado à menor tendência destas à despolimerização por β -eliminação.

6.7.6.1 Efeito da cocção sobre o grau de polimerização dos polissacarídeos

O tratamento térmico produziu mudanças visíveis no peso molecular dos polímeros de feijões novos, causando redução do grau de polimerização dos polissacarídeos da fração H4, cujos valores passaram de 1.577 para 604 kDa (redução de 62%) (Figura 32). Isto demonstra que o material péctico proveniente da fração H4 é degradado durante a cocção. O grau de polimerização dos polímeros da FSA passa de 2.170 kDa para 2.987 kDa, representando uma elevação de 38% em seu peso molecular (Figura 32). Na fração H1 o valor aumenta em 518 kDa com a cocção.

Analizando feijões HTC, verifica-se que após cocção prolongada, o grau de polimerização das frações H1 e H4 aumentam em 17% e da FCDTA em 37% (Figura 32). A elevação do peso molecular dos polímeros de feijões HTC pode sugerir que novas interações químicas foram formadas, causando modificações no tamanho, na sua conformação espacial da molécula e também menor quebra de ligações glicosídicas.

É provável que a redução no peso molecular dos polímeros da fração H0,5 em amostras envelhecidas, esteja relacionada à presença de amido resistente, que apresenta uma estrutura menos complexa e ramificada do que os polímeros da parede. Entretanto, as demais frações que não possuem contaminação com amido, observa-se elevação no peso molecular.

Figura 32: Efeito do cozimento sobre o peso molecular das frações. Distribuição de peso molecular das frações pécicas da parede celular de feijão cozido obtidas através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose CL4B. **FSA**, fração solúvel em água; **FCDTA**, fração solúvel em solução de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em hidróxido de sódio 0,01; 0,5; 1,0 e 4,0 M; **O Cru**; **5 Cozido**.

As principais alterações no perfil de pesos moleculares dos polissacarídeos de parede celular estão sumarizados no Quadro 2.

<i>Alterações observadas em feijões endurecidos</i>			
Armazenamento 30 °C/75% UR	↑ PM:	FSA	↓ PM: H1 e H4
		H0,01	
Após cocção	↑ PM:	FSA	
		FCDTA	↓ PM: H0,5
		H4	

Quadro 2: Resumo das principais alterações no peso molecular dos polissacarídeos de parede celular. **FSA**, fração solúvel em água, **FCDTA**, fração solúvel em solução de CDTA e **H0,01-H4**, frações solúveis em NaOH 0,01-4M.

6.7.7 Alteração na composição de monossacarídeos das frações polissacarídicas.

Com o envelhecimento das sementes, verifica-se queda acentuada no conteúdo de açúcares das frações FSA e FCDTA em amostras cruas, principalmente nos valores de AU (50% e 66%) e arabinose (45% e 64%)(Figura 33). Paralelamente, nota-se aumento de arabinose nas frações H0,01 (ambos 59%), H0,5 (ambos 91%), AU (15 e 77%) e xilose (45 e 41%). O conteúdo de galactose triplica na fração H0,01 e eleva em 91% na fração H0,5. Em relação aos polímeros da fração H1, verifica-se redução nos valores de todos os açúcares, especialmente de arabinose (22%) e xilose (38%). O conteúdo de galactose cai 15% e os de fucose e xilose 77 e 38% (Figura 33). A fração H4 apresenta decréscimo nos valores de arabinose, galactose e glicose em 2, 6 e 51%. Concomitantemente, o conteúdo de AU aumenta em 58% (Figura 33). O resíduo rico em celulose apresenta aumento no conteúdo de arabinose e AU (45 e 39%), indicando maior interação entre a celulose e a pectinas em feijão envelhecido.

A cocção aumenta a solubilidade dos polissacarídeos em água, como pode ser visto pelo acréscimo causado na recuperação de açúcares da FSA (Figura 33). Comparando feijões cozidos, verifica-se que o envelhecimento não alterou o perfil de açúcares da fração. Em feijões novos a cocção causa perda da fração CDTA, em feijões envelhecidos, a perda de arabinose é 14% maior em relação à amostra novas (Figura 33). O conteúdo de glicose nas frações H0,5 e H1 aumenta em feijões envelhecidos com a cocção devido à formação de amido resistente. Observa-se, também, aumento no conteúdo de arabinose que triplica em H0,5 e sobe 85% em H1, indicando perda de solubilidade das pectinas. O conteúdo de AU quadruplica na fração H0,5 e o de xilose aumenta 92% em sementes envelhecidas cozidas.

Figura 33: Perfil de açúcares das frações obtida do FIA de feijões novos e envelhecidos cozidos. Valores apresentados em μg de açúcar por mg de farinha de cotilédono. **FSA**, fração solúvel em água; **FCDTA**, fração solúvel em solução de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em hidróxido de sódio 0,01; 0,5; 1,0 e 4,0 M. Açúcares: **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Resíduo**, resíduo rico em celulose ($n = 3$).

Em relação ao polímeros da fração H4, nota-se que a recuperação de monossacarídeos em feijão envelhecido cozido é maior. O resíduo, por sua vez, apresenta aumento no conteúdo de AU (53%), arabinose (27%) e xilose (39%) (Figura 33).

De acordo com a literatura, em feijões verdes a cocção solubiliza os componentes pécicos através da dissolução e depolimerização de polissacarídeos ricos em arabinose (STOLLE-SMITS *et al.*, 1995). Este processo é menos acentuado em feijões HTC, provavelmente, devido ao comprometimento dos polissacarídeos com novas ligações. Estes polissacarídeos também mostram-se menos propensos à depolimerização, o que os tornam menos solúveis em água. Também é provável que as pectinas estejam mais hidrofóbicas, dificultando a entrada de água nas células. Com menos água disponível, a gelatinização do amido, a expansão das células e o rompimento da lamela média ficariam comprometidos.

A maior hidrofobicidade pode ser resultado da polimerização dos compostos fenólicos e do comprometimento dos mesmos com a formação de ligações cruzadas. Garcia *et al.* (1998) observaram que o conteúdo de ácidos fenólicos ligados às pectinas solúveis em água era 2 vezes maior em feijões HTC do que no controle. Entretanto, a fração insolúvel em água apresentava conteúdo de ácido ferúlico 4 vezes superior em amostras controle do que em HTC. Os mesmos autores verificaram a presença de ácidos fenólicos na parede celular de feijão e, também, o envolvimento destes no endurecimento de feijões. Feijões novos perdem grande quantidade de material pécico insolúvel em água durante a cocção, o mesmo não ocorrendo em feijões HTC.

Como a maioria dos polímeros do FIA são provenientes da parede primária, verifica-se que a perda de material pécico não envolve somente as pectinas da lamela média, ao contrário do que é apregoado amplamente pela literatura. Shomer *et al.* (1990) notaram que a estrutura microfibrilar da parede celular de feijões HTC não se alterava com a cocção. A literatura também reporta o espessamento da parede primária e o aumento da deposição de dióxido de manganês nesta estrutura, indicando o incremento no conteúdo de fenólicos nas região da lamela média (SHOMER *et al.*, 1990; BHATTY, 1990). Portanto, é provável que a combinação de vários fatores pode

cause a insolubilização das pectinas presentes na lamela média e parede primária durante o desenvolvimento do HTC.

6.8 Efeitos do envelhecimentos na estrutura dos polissacarídeos da parede celular.

6.8.1 Casca

Com o envelhecimento das sementes, os valores de arabinose 5-, 2,5- e 3,5-ligadas em caem em 25%, 2 e 43% na FSA (Figura 34^(A)). Paralelamente, o conteúdo de manose 2-ligada aumenta 18 vezes e o de manose terminal triplica (Figura 34^(D)). A elevação nos valores de manose está relacionado com a presença de contaminação proveniente das enzimas utilizadas na extração. A redução na solubilidade em água dos polissacarídeos pécnicos da casca com o envelhecimento provoca aumento na proporção de contaminantes na FSA. O envelhecimento da semente também leva à redução no conteúdo de arabinose nesta fração (Figura 34).

Figura 34: Análise da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) do tegumento de feijões novos e envelhecidos. A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, a piranose. Por convenção, a ligação no C-1 não é citada.

A FIA, por sua vez, sofre redução nos conteúdos de 2-galp, 4-glcp e 4,6-glcp (26, 23 e 31%, respectivamente), indicando que a fração possui menos XG_(s) (Figura 34^(C)). Também foi verificada a redução no conteúdo de 5-araf, 3,5-araf e 2,5-araf em 12, 44 e 35% (Figura 34^(A)). Por outro lado, houve incremento na quantidade de xilose 4-ligada em 42%, que pode estar relacionada com elevação no conteúdo de xilanos, evidenciando um prenúncio de lignificação.

6.8.2 Cotilédono.

Em sementes envelhecidas, a FSA apresenta valor superior de manose terminal e 2-ligada 64 e 21% (Figura 35^(D)). Como comentado anteriormente, isto se deve à perda da solubilidade das pectinas em água, o que provoca aumento na proporção de contaminantes nesta fração.

Figura 35: Análise de ligações dos polissacarídeos da fração solúvel em água (FSA) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8meses. A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose.

A redução nos valores de arabinose terminal e 5-ligada (18 e 14%) pode estar relacionada com a redução no tamanho das cadeias de arabinanos (Figura 35^(A)). Nota-se, também, o acréscimo nos valores de *t-glcp*, 4-glcp e 4,6-glcp (9, 46 e 55%),

paralelamente à elevação no conteúdo de *t*-xilp e *t*-galp (15 e 12%), denotando maior conteúdo de xiloglicanos (Figura 35^(B)).

A fração contendo de pectinas ligadas ao cálcio (FCDTA) mostrou decréscimo acentuado nos teores de arabinose terminal e 5-ligada (15 e 16%, respectivamente), à semelhança da FSA (Figura 36^(A)). Os resíduos *t*-xilp, 2-xilp e 4,6-glcp duplicaram, indicando aumento no conteúdo de xiloglicano. Reforçando a suposição, também verifica-se o aumento no conteúdo de glicose 4-ligada que triplica (Figura 36^(B)). O acréscimo na proporção de glcp 4-ligada e 4,6-ligada indica que a porcentagem de polímeros hemicelulósicos é maior na FCDTA de sementes endurecidas.

Parte da xilose terminal provavelmente está associada à presença de xilogalacturonanos (XGA) e o seu aumento acentuado pode indicar que sua quantidade é maior em sementes HTC. Os dados obtidos por cromatografia em fase gasosa também apontam o aumento de xilose nesta fração e apoiam o postulado.

Figura 36: Análise de ligações dos polissacarídeos da fração solúvel em CDTA (FCDTA) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8meses. A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa (n = 3). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose.

Os polissacarídeos relativos aos polímeros em P2, obtidos pela cromatografia de troca aniônica apresentaram perda de araf terminal, 5-ligada e 2,5-ligada (4, 10 e 14%, respectivamente) e aumento no conteúdo de xilose terminal (77%) indicando maior conteúdo de XGA em sementes envelhecidas (Figura 37^{(A); (B)}). Esta fração continha quantidade mínima de contaminação enzimática, de forma a refletir com maior fidelidade as alterações ocorridas com as pectinas da FSA.

A fração formada por polissacarídeos solúveis em base fraca (FBF) não apresentou alteração acentuada na natureza de seus polímeros com o envelhecimento das sementes, mostrando perfil semelhante ao mostrado nas frações FSA e FCDTA (Figura 38). Teoricamente, os polímeros da FSA e FCDTA deveriam ser constituídos, em sua maioria, por polissacarídeos pécticos e os solubilizados com base fraca (FBF) por polissacarídeos hemicelulósicos (SELVENDRAN & O'NEIL, 1987; BRETT & WALDRON, 1996). Entretanto, esta tendência não foi verificada em feijão, nem em *Vigna*, ervilha e *Phaseolus coccineus* (RYDEN & SELVENDRAN, 1990; TALBOT & RAY, 1992; GOONERATNE *et al.*, 1994^b).

Figura 37: Análise de ligações dos polissacarídeos da fração solúvel em água (FSA) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses, obtido após separação por cromatografia de troca aniônica. A fração analisada corresponde aos polímeros ricos em pectina obtidos no pico 2. A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose.

Na fração solúvel em base fraca (FBF), o endurecimento da semente causou a elevação no conteúdo de arabinose terminal (16%) e a redução nos valores de 5-ara_f (7%), 2,5- e 3,5 ara_f (9 e 13%, respectivamente) (Figura 38^(A)). Isto significa que, em feijões HTC, os arabinanos apresentam-se menos ramificados, justificando a redução observada no peso molecular desta fração em sementes HTC. Percebe-se, também, o decréscimo no conteúdo de glicose terminal, 4- e 4,6-ligada (12, 19 e 43%) e de galactose terminal e 2-ligada (15 e 100%) (Figura 38^(B)). Entretanto, o conteúdo de xilose terminal aumentou em 24%, denunciando que parte dos resíduos *t*-xil_p não estão associados aos xiloglicanos.

As frações FCDTA, FBF e os polímeros da FSA (relativo aos polímeros de P2, obtidos por cromatografia de troca iônica), apresentaram em comum o aumento acentuado nos valores de *t*-xil_p com o desenvolvimento do HTC (Figura 36^(B), 37^(B) e 38^(B)). Presumivelmente, a elevação no conteúdo de *t*-xil_p está relacionada às pectinas ácidas conhecidas como xilogalacturonanos (XGA). Resumindo, o fato mais recorrente foi o aumento na quantidade de xilose terminal em todas as frações analisadas. O aumento parece estar relacionado com os XGA. A elevação no conteúdo de ácidos urônicos nas frações analisadas reforçam o postulado.

Figura 38: Análise de ligações dos polissacarídeos da frações solúveis em base fraca (FBF), de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses. A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose. A fração correspondente à soma das frações H0,01; H0,5 e H1

Dessa forma, duas suposições são possíveis; **1)** redução na solubilidade das pectinas ácidas devido à criação de interações interpoliméricas, a exemplo, formação de pontes de cálcio, ligações éster e éter envolvendo resíduos de tirosina e ácido ferúlico; **2)** A ativação da PME causando redução no grau de metilesterificação das pectinas levando ao impedimento da reação de β -eliminação. O peso molecular elevado observado na FSA de sementes envelhecidas corrobora o postulado.

Os polissacarídeos da fração H4 são fortemente ligados, e perfazem a grande parte da parede celular de feijão. A diminuição no conteúdo de arabinose 5-ligada (7%), denuncia encurtamento no comprimento da cadeia polissacarídica (Figura 39^(A)). Não foram observadas alterações marcantes nesta fração, contudo, nota-se que o conteúdo de *t*-xilp reduz em 6%, embora os valores de glicose 4- e 4,6-ligadas se elevem em 30 e 26% (Figura 39^(B)). Novamente, indica que a alteração no conteúdo de *t*-xilp não está associado aos xiloglicanos, mas sim aos XGA(s).

Figura 39: Análise de ligações dos polissacarídeos da frações solúveis em NaOH 4M (H4) de feijões controle e armazenados à 30°C / 75% UR / 8 meses. A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo C-1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose.

Quantidades muito baixas de galp 3,6- e 6-ligada presentes nesta subfração, provavelmente são provenientes de AGII (Figuras 35^(IC) a 39^(IC)). Segundo os dados obtidos, há forte indício da presença de proteínas ricas em arabinogalactanos. Os resíduos de galp 4-ligada sugerem que a parede é composta por galactanos ao invés de

AGI. Esta afirmativa é corroborada pela ausência dos resíduos de 3,4-galp que indicam o ponto de ramificação na posição 3. Conclui-se, portanto que há forte evidência da presença de galactanos, arabinanos e possivelmente de AGII. Este padrão também foi encontrado na parede celular de ervilhas, *Phaseolus coccineus* e *Vigna* (TALBOTT & RAY, 1992; RYDEN & SELVENDRAN, 1990; GOONERATNE *et al.*, 1994^b).

6.8.3 Análise de ligação das frações tratadas enzimaticamente

A especificidade das enzimas pode apontar a existência de determinados polissacarídeos. Neste caso, o uso de celulase e EPG é capaz de mostrar a presença de XG e poligalacturonanos. A identificação é feita através da separação dos produtos de hidrólise (oligômeros) através da precipitação dos polissacarídeos em etanol 80%.

Desta forma, a hidrólise realizada com celulase de *Trichoderma sp* e com EPG produziu duas subfrações: uma etanólica, contendo os produtos de hidrólise das respectivas enzimas (oligômeros) e outra insolúvel em etanol, composta pelos polissacarídeos que não foram hidrolisados. Ambas as frações foram analisadas após a metilação, hidrólise e acetilação por espectrometria de massa.

6.8.3.1 Frações tratadas com celulase.

A Figura 40 traz o perfil de monossacarídeos parcialmente metilados: (I) fração etanólica, rica em oligômeros de xiloglicanos (XG); (II) fração insolúvel em álcool, contendo pectinas de peso molecular elevado.

O tratamento da FSA com celulase promoveu hidrólise dos xiloglicanos, cujos oligômeros foram retidos no extrato etanólico (Figura 40^(I)). O extrato etanólico, revelou-se rico em resíduos de glicose, demonstrando que a separação foi bem sucedida. Os dados obtidos desta subfração mostrou que, em sementes envelhecidas, o conteúdo de glicose 4-ligada reduziu em 51% e os valores de *t*-xilp, *t*-glcp e 4,6-xilp desapareceram (Figura 40^(IB)). Como a quantidade de *t*-xilp e glcp 4,6-ligada era muito baixa (5 e 1%), concluiu-se que a glcp 4-ligada, talvez não fosse proveniente de XG, podendo ser oriunda de outro polímero. Entretanto, Ryden e Selvendran, (2001) reportam a existência de xiloglicanos contendo menor grau de ramificação em polímeros extraídos com NaOH 4M da parede celular de *Phaseolus coccineus*.

Quantidades elevadas de *t-araf* e 5-*araf* estavam presentes em sementes envelhecidas. Os conteúdos de arabinose 5- e 3,5-ligada eram 70 e 75% superiores ao apresentado por amostras normais (Figura 40^(IA)). A maior parte desta arabinose, possivelmente, compõe a estrutura de arabinanos muito ramificados, haja vista o elevado conteúdo de resíduos 3,5-*araf* e 2,5-*araf* em amostras envelhecidas (Figura 40^(IA)). O maior grau de ramificação fornece uma estrutura globular e impede o alinhamento das cadeias, além de dificultar a sua desidratação pelo etanol, daí a sua solubilidade.

Figura 40: Análise da fração solúvel em água (FSA), rica em xiloglicanos, obtidos após a hidrólise do material com celulase de *Trichoderma sp.* A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa. Nomenclatura: a numeração aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose ($n = 3$). (I), fração solúvel em álcool, rica em xiloglicanos; (II) fração insolúvel em álcool, rica em pectinas.

A fração insolúvel em álcool, rica em pectinas, era a fração mais abundante e possuía grande quantidade de resíduos *t-araf* e 5-*araf* e pequena quantidade de 3,5-*araf* (29, 34 e 9%, respectivamente) (Figura 40^(IIA)). Com o desenvolvimento do

HTC, verificou-se a redução no conteúdo de arabinose terminal (50%) e aumento de arabinose 5-ligada (54%). Em sementes envelhecidas, os arabinanos se apresentaram menos ramificados, mais lineares e com maior peso molecular. Assim se supõe, devido à redução drástica no conteúdo de *t-araf* e nos pontos de ramificação em C-3 e C-5, bem como pelo valor elevado de resíduos 5-*araf* (Figura 40^(IIA)).

Sumariando, em sementes envelhecidas, a perda de *t-araf* (39%) e o aumento de 5-*araf*, mostram que os arabinanos passam a ter cadeias polissacarídicas com uma estrutura mais linear e longa (Figura 40^(IA); ^(IIA)). Como os arabinanos ramificados são o componente majoritário na parede celular de feijão, a perda de suas cadeias laterais pode estar relacionada com a diminuição da solubilidade das pectinas. As moléculas lineares favorecem o alinhamento das cadeia poliméricas e permitem a formação de pontes de H intermoleculares, produzindo uma estrutura menos solúvel.

Parte da xilose terminal (7,4%) retida na fração péctica indica sua associação com as pectinas. A ausência de glicose 4,6-ligada (um indicativo da presença de xiloglicanos), corrobora a observação (Figura 40^(IIB)). Conclui-se, deste modo, que a FSA possui principalmente polissacarídeos pécticos contendo XGA e quantidades ínfimas de xiloglicano. Os baixos valores de galactose 4- e 6-ligada demonstram que os galactanos estão presentes em pequenas quantidades. A ausência de pontos de ramificação C-3 na galactose excluem a possibilidade de haver AG(s) na amostra (Figura 40^(IIC)).

Os polímeros da FCDDTA possuíam uma fração solúvel em etanol formada por grande quantidade de arabinose terminal (32%) e 5-ligada (31%) (Figura 41^(IA)). Com o envelhecimento das sementes, houve redução nos valores de *t-araf* (48%) e 5-*araf* (29%). Não houve alteração no conteúdo de 2,5-*araf*, porém o teor de 3,5-*araf* reduziu 20% (Figura 41^(IA)). Os dados indicam redução no comprimento da cadeia polissacarídica dos arabinanos. O teor de 4-*glcp* aumentou 6 vezes, de 2-*galp* triplicou e o de 2-*xilp* quadruplicou, indicando aumento no conteúdo de xiloglicanos. O aumento substancial na quantidade de 4-*glcp* mostra que os xiloglicanos presentes estão menos ramificados (Figura 41^(IB)).

A fração insolúvel em etanol da FCDDTA era composta por grande quantidade de resíduos *t-araf*, 5-*araf* e 3,5-*araf* (29, 45 e 9%, respectivamente), possuindo,

também, *t*-xilp (4%), provavelmente associada à pectina (Figura 41^(IIA; B)). A diminuição nos teores de *t*-araf (26%) e 2,5-araf (16%) demonstram, mais uma vez, que em feijões HTC os arabinanos possuem cadeias mais longas e lineares.

Figura 41 Análise da fração solúvel em CDTA (FCDTA), rica em xiloglicanos, obtidos após a hidrólise do material com celulase de *Trichoderma sp.* A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose; (I), fração solúvel em álcool, rica em xiloglicanos; (II) fração insolúvel em álcool, rica em pectinas.

A fração solúvel em base fraca (FBF), constituída pelos polissacarídeos solubilizados com NaOH 0,01-1,0 M apresentavam indícios da presença de xiloglicanos (Figura 42^(IB)). O extrato etanólico contém grande quantidade de resíduos *t*-xilp (15%) e 2-xilp (5%) e também, de *t*-glcp, 4-glcp e 4,6-glcp (4, 6 e 10%). A presença de 2-galp, *t*-galp e *t*-fuc (9, 4 e 2%) reforçaram os indícios da presença de xiloglicanos (Figura 42^(IB)). Com o envelhecimento houve redução no conteúdo de 4,6-glcp em 12%, embora o teor de 4-glcp se elevasse em 10% (Figura 42^(IA)). A queda nos valores de *t*-xilp (39%),

t-galp (9%), 2-galp (18%) e *t*-fuc (100%) pode significar que o envelhecimento acelerado causa redução das ramificações dos xiloglicanos em feijão.

O envelhecimento das sementes também provocou aumento dos resíduos 2,5-araf (77%) e 3,5-araf (35%) nesta fração e, embora isto indique maior grau de ramificação, o acréscimo de arabinose 5-ligada (24%), concomitante à redução de arabinose terminal (14%) apontam para uma estrutura menos fragmentada (Figura 42^(IA)).

Figura 42: Análise da fração solúvel em base fraca (FBF), rica em xiloglicanos, obtidos após a hidrólise do material com celulase de *Trichoderma sp.* A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, piranose; (I), fração solúvel em álcool, rica em xiloglicanos; (II) fração insolúvel em álcool, rica em pectinas.

A fração péctica continha quantidades substanciais de arabinose terminal e 5 ligada (33 e 37%, respectivamente) (Figura 42^(IIA)). Estes dados demonstram que, nesta fração, os arabinanos possuem cadeias curtas, menores que os observados na FCDTA, o que justifica o baixo peso molecular, denunciado pelo perfil de

cromatografia de exclusão molecular. Novamente foi registrada a presença de grande quantidade de xilose na subfração pécica (Figura 42^(IB)).

A fração H4, responde por 31% do total de polímeros de parede celular do feijão. Em sua fração etanólica observam-se quantidades elevadas de monômeros provenientes de xiloglicanos. O conteúdo de glicose terminal, 4- e 4,6 ligada era de 6, 4 e 14%, respectivamente, o de xilose terminal e 2-ligada, 13 e 4%. Também foram encontradas grandes quantidades de galp terminal e 2-ligada (8 e 12%) (Figura 43^(IB)). A presença de 1,5 % de fucose na fração etanólica pode indicar que os XG, ali encontrados, são fucosilados (Figura 43^(IB)).

Figura 43: Análise da fração solúvel em NaOH 4M (H4), rica em xiloglicanos, obtidos após a hidrólise do material com celulase de *Trichoderma sp.* A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 3$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação **t**, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; **f**, refere-se a furanose e **p**, a piranose; **(I)**, fração solúvel em álcool, rica em xiloglicanos; **(II)** fração insolúvel em álcool, rica em pectinas.

Com o envelhecimento das sementes há perda de galactose terminal e 2-ligada (32 e 21%), bem como de xilose terminal (25%), novamente indicando a perda de ramificação dos xiloglicanos em sementes envelhecidas. Os arabinanos desta fração, por sua vez, mostraram-se menos fragmentados, e mais ramificados como pode ser observado pela queda nos valores de *t-araf* (44%) e aumento nos de 5-*araf*; 2,5-*araf* e 3,5-*araf* (24, 84 e 55%) (Figura 43^(IB)).

Na fração pécica, verifica-se, principalmente, a presença de arabinanos ramificados (Figura 43^(IIA)). O conteúdo de xilose terminal é particularmente baixo nesta fração e indica que há pouco XGA nos polímeros da fração H4. Com o envelhecimento verifica-se, principalmente, perda de ramnose e galactose, cujos conteúdos em feijões novos já são normalmente baixos.

A análise da fração pécica revelou que esta era constituída basicamente por arabinanos ramificados de cadeias curtas comparado às demais frações estudadas, o que justificaria o seu menor peso molecular (Figura 43^(IIA)). O extrato etanólico também possuía arabinanos mais ramificados, porém com baixo grau de polimerização, o que justifica a sua solubilidade (Figura 43^(I)). Com o envelhecimento das sementes, verifica-se a perda de ramificação dos arabinanos e xiloglicanos, tornando-os menos solúveis.

A presença de xiloglicanos em sementes de leguminosas encontra-se bem reportado na literatura. A estrutura dos xiloglicanos de soja foi estudado por HUISMAN *et al.* (2000). De acordo com os dados obtidos pelo grupo, o xiloglicano de soja é formado por fragmentos de XXG, XXXG, XXFG, XLXG e XLFG. O resultado da espectrometria de massa com ionização por electrospray triplo quadrupolo com leitura no modo positivo, revelou que em feijões, a maioria dos fragmentos é formada por oligômeros XXXG e talvez por XXLG ou XLXG (anexo). Não foi constatado, entretanto, presença de fragmentos fucosilados nas frações H1 e H4, embora a fucose estivesse presente nas amostras. Os dados obtidos confirmam maior presença de xiloglicano no extrato etanólico das frações FBF e H4.

Em resumo, os feijões HTC possuem os arabinanos e xiloglicanos menos ramificados e, portanto, menos solúveis e galacturonanos menos propensos a sofrer despolimerização por mecanismo de eliminação em β

6.8.3.2 Frações tratadas com endopoligalacturonase (EPG)

O tratamento com EPG não proporcionou uma separação tão nítida entre os componentes pécnicos e hemicelulósicos quanto o tratamento com celulase. Também não causou aumento no grau de dispersão das amostras, como observado pelo perfil de eluição em coluna de exclusão molecular (dados não apresentados). Os resultados indicam que não houve quebra de ligações glicosídicas ou que poucos pontos sofreram hidrólise. Porém, é mais provável que a separação dos componentes pécnicos e hemicelulósicos seja difícil, visto que as frações são constituídas, predominantemente, por arabinanos de elevado peso molecular que coprecipitam em solução etanólica com os xiloglicanos, dificultando a análise.

O tratamento da FSA com EPG produziu uma subfração insolúvel em etanol contendo arabinanos ramificados de peso molecular elevado (Figura 44^(I)). Esta subfração também possuía grande quantidade de xilose terminal (14%), cujo valor é 52% menor em sementes envelhecidas.

A fração etanólica possui pouca arabinose e valores extremamente elevados de glicose 4-ligada (38%) e galactose 2-ligada (22%) (Figura 44^(IIb)). Estes valores reduzem drasticamente (33 e 59%) em sementes HTC.

Não foi possível explicar, contudo, a origem da glicose 4-ligada e da galactose 2-ligada. Dado o baixo conteúdo de glicose 4,6- ligada e de xilose 2-ligada, descarta-se a possibilidade destes resíduos serem provenientes de XG. Provavelmente, devem ter se originado de fragmentos dispersos, haja vista esta fração conter quantidade muito baixa de material passível de ser analisado. Os resíduos de 5-arap; 3,5-arap e 2,5-arap em sementes envelhecidas eram 2, 4 e 3 vezes superiores às de sementes novas, entretanto, a quantidade de *t-araf* era 50% menor, demonstrando que estes polímeros possuem estrutura mais lineares (Figura 44^(IIa)).

Figura 44: Análise da fração solúvel em água (FSA), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG). A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 2$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, a piranose; (I), fração insolúvel em álcool, rica em xiloglicanos; (II) fração solúvel em álcool, rica em pectinas.

A fração insolúvel em álcool da FCDTA contém grande quantidade de arabinanos ramificados e de elevado peso molecular. Isto pode ser verificado pela quantidade elevada de 5-araf (32%) e pelos pontos de ramificação 3,5 e 2,5-araf (ambos 6%). O conteúdo elevado de *t*-araf (28%) é um indício de que as ramificações são constituídas por apenas um único resíduo de arabinose ligado às posições 2 e 3 da molécula (Figura 45^(IA)). Diferenças mínimas entre sementes novas e envelhecidas foram notadas.

Figura 45: Análise da fração solúvel em CDTA (FCDTA), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG). A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 2$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, a piranose; (I), fração insolúvel em álcool, rica em xiloglicanos; (II) fração solúvel em álcool, rica em pectinas.

Em feijões envelhecidos a fração solúvel em etanol continha maior quantidade de *t-araf* (3,5 vezes) e menor de *2,5-araf* (35%) e *3,5-araf* (48%), indicando estrutura menos ramificada, porém, mais fragmentada (Figura 45^(IIA)).

A fração insolúvel em álcool da FBF de sementes envelhecidas possuíam menor quantidade de resíduos provenientes de xiloglicanos (Figura 46^(IB)). Também continha maior número de pontos de ramificação nos arabinanos, e menor quantidade de resíduos *t-araf* (Figura 46^(IA)), denotando a presença de polímeros de peso molecular elevado.

Figura 46: Análise da fração solúvel em base fraca (FBF), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG). A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 2$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação **t**, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; **f**, refere-se a furanose e **p**, a piranose; **(I)**, fração insolúvel em álcool, rica em xiloglicanos; **(II)** fração solúvel em álcool, rica em pectinas.

Os polissacarídeos insolúveis em álcool da fração H4 possuem arabinanos de cadeias curta contendo vários pontos de ramificação em C-2 e 3. Com o envelhecimento das sementes os arabinanos tornam-se menos ramificados e passam a apresentar quantidades elevadas de arabinose terminal, indicando que suas cadeias poliméricas tornaram-se mais curtas (Figura 47^(IA)).

A fração solúvel em etanol, igualmente rica em arabinanos ramificados, também sofre alteração com o envelhecimento das sementes (Figura 47^(IIA)). Em sementes envelhecidas o conteúdo de arabinose terminal é maior, indicando a redução no grau de polimerização dos arabinanose. A fração etanólica também perde

xiloglicanos, esta perda é demonstrada pela redução nos teores de glicose 4- e 4,6-ligada (35 e 52%) (Figura 47^(IIB)).

Figura 47: Análise da fração solúvel em NaOH 4M (H4), rica em xiloglicano (XG) e pectina, obtidos após a hidrólise do material com celulase de endopoligalacturonase (EPG). A composição é dada em porcentagem molar, após análise da estrutura química por espectrometria de massa ($n = 2$). Nomenclatura: a numeração corresponde aos carbonos nos quais o oxigênio encontra-se substituído. A notação *t*, refere-se a moléculas terminais, ligadas pelo carbono 1; *f*, refere-se a furanose e *p*, a piranose; (I), fração insolúvel em álcool, rica em xiloglicanos; (II) fração solúvel em álcool, rica em pectinas.

Devido ao fato do tratamento com EPG não resultar em uma separação satisfatória dos polímeros, a análise baseou-se mais nos resultados obtidos com a celulase. A análise dos espectros de massa obtidos do material péctico resultante do tratamento com celulase, demonstra que, em feijões envelhecidos, os arabinanos possuem maior grau de polimerização (Figura 48^A) e, no geral, menor grau de ramificação. O elevado grau de polimerização dos arabinanos na FSA de amostras envelhecidas corrobora os dados e cromatografia de exclusão molecular que indicam maior PM dos polímeros desta fração.

Concluindo, a hidrólise com celulase produziu melhor separação dos componentes da parede celular, indicando que a ação da EPG não foi tão eficaz quanto a da celulase. A exemplo disso, não foi notada uma clara separação remoção de xiloglicanos nas frações FBF e H4 que, como demonstrado, apresentam este polímero em sua composição. O tratamento com celulase contribuiu para identificar quais polissacarídeos estavam presentes na FSA e FCDTA. A análise de ligações realizada após a hidrólise enzimática dos polissacarídeos revelou que estas frações são ricas em pectina e grande parte da massa de xilose terminal é proveniente das pectinas ácidas.

Figura 48: Comprimento da cadeia polimérica (A) e porcentagem de ramificação dos arabinanos (B) da fração insolúvel em álcool em amostras tratadas com celulase. O comprimento é dado em resíduos de arabinose e a ramificação em porcentagem molar. Os símbolos cheios representam amostras envelhecidas e os vazios amostras novas.

Os resultados sugerem que a fração H4 e FBF concentram grande quantidade de arabinanos e a maior parte do XG presente na parede celular. A quantidade elevada de xilose terminal encontrada na FSA e FCDTA provinha das pectinas. A literatura relata a existência de uma classe separada de HGA substituídos que possuem metade de seus resíduos substituídos com unidades de α -D-xilp na posição 3 (CARPITA & MCCANN, 2000). Estes polissacarídeos, denominados xilogalacturonanos (XGA), provavelmente estão presentes no feijão, ligadas à parede celular através de interações fracas. Ryden e Selvendran (1994) e Gooneratne *et al.* (1994^b) também encontraram evidências da presença destes compostos na parede celular *Phaseolus coccineus* e *Vigna radiata*. Esta hipótese foi confirmada quando as frações polissacarídicas da parede celular foram tratadas com celulase e grande parte da xilose terminal permaneceu nas frações ricas em pectina. Os XG, por sua vez, foram extraídos com etanol 80% e identificados pela presença dos resíduos de glcp 4- e 4,6-ligados. Conclui-se, portanto, que grande parte da xilose terminal está associada às pectinas e uma pequena parcela está ligada aos XG_(s).

Os estudos com sementes HTC revelaram indícios da participação da PME no processo de desesterificação das pectinas e formação de pectatos insolúveis (JONES & BOULTER, 1983, LIU, 1995, REYES-MORENO & PAREDES-LÓPEZ, 1993). No presente trabalho, foram encontradas evidências preliminares do envolvimento do grau de metilesterificação das pectinas com o HTC. Apesar do conteúdo de pectinas ácidas no feijão ser relativamente baixo, ainda assim, é provável que o grau de metilesterificação influencie na dureza do grão. Porém, devido à natureza complexa dos eventos que acompanham o processo de endurecimento em leguminosas, acredita-se que mais de um mecanismo esteja envolvido.

Uma das possibilidades levantada por Neves (2000) é o aumento na recuperação das frações solúveis em base fraca devido à elevação no conteúdo de proteínas ricas em hidroxiprolina. Os resultados obtidos neste trabalho complementam os trabalhos de Neves (2000) e Udaeta (1998) que verificaram alterações no conteúdo de proteína estrutural e de fenólicos ligados em feijões HTC. Em feijões Carioca-Pérola também foi observada maior recuperação nestas frações. Outra evidência é a alteração na estrutura dos arabinanos e XG. Em sementes envelhecidas, estes polímeros parecem perder parte de suas ramificações. Estruturas

mais lineares facilitam a interação entre as cadeias poliméricas e a formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, reduzindo a solubilidade dos polissacarídeos.

Outros componentes também participaram do processo, como o amido que apresenta aumento no grau de cristalinidade, resultando em resistência ao ataque enzimático. O aumento na cristalinidade do amido em amostras HTC também foi observado por Garcia e Lajolo, (1994).

As cascas, por sua vez, desempenharam papel importante, apresentando redução na solubilidade de seus polissacarídeos. Os dados obtidos estão de acordo com os obtidos da literatura, que citam a participação das proteínas de reserva, a impermeabilização das cascas pela polimerização dos compostos fenólicos e o metabolismo de fenólicos como sendo um mecanismo semelhante à lignificação (HINCKS & STANLEY, 1986 e GARCIA *et al.*, 1998; HUSSAIN & BUSHUK, 1991; STANLEY *et al.*, 1989). Conclui-se, desta forma, que o HTC é decorrente de várias alterações que, em conjunto, causam a resistência das sementes ao amaciamento por cocção. A insolubilização das pectinas, observada em sementes envelhecidas pode estar contribuindo, juntamente com os demais fatores, para o desenvolvimento do HTC

7 CONCLUSÕES

A parede celular da casca consiste em 71% de material insolúvel em água (FIA) e 3% de material solúvel em água (FSA). A parede celular da casca de feijões possui grande quantidade de xilanos, XG e celulose na FIA e arabinanos e galacturanos na FSA. A composição de açúcares, o perfil de ligações, a solubilidade e o perfil de peso molecular se alteram com o desenvolvimento do HTC, revelando insolubilização dos polissacarídeos e indícios de lignificação, denunciados pelo aumento no conteúdo de xilanos e na recuperação dos polissacarídeos.

A parede celular do cotilédone de feijão é constituída por grande quantidade de polissacarídeos péclicos, ricos em arabinanos ramificados de elevado peso molecular. Juntas, a fração solúvel em água (FSA) e a fração solúvel em NaOH 4M (H4) respondem por 68% dos polissacarídeos presente na parede celular. O resíduo

rico em celulose representa 13% do total e a fração solúvel em CDTA 7%. Os 12% restantes são solúveis em base fraca e distribuem-se pelas frações H0,01 a H1. As frações solúveis em água (FSA) e CDTA (FCDTA) são formadas por polímeros pectícos ricos em arabinose e AU(s). As frações solúveis em solução de hidróxido de sódio 0,01-4M possuem, principalmente, arabinanos e XG. O fracionamento da FSA em coluna de troca aniônica produz três picos distintos. O primeiro pico é composto por polímeros neutros, o segundo por ácidos e neutros, e o terceiro por grande quantidade de AU.

A análise de ligações dos polímeros da parede celular do cotilédone indicam a presença de RGI, que podem conter ramificações de galactanos 4- e 6-ligados e arabinanos de cadeia curta. Valores reduzidos de ramnose 2- e 2,4-ligadas sugerem poucos pontos de ramificação nos galacturonanos. A composição química demonstrou que as pectinas ácidas de feijão possuem, principalmente, domínios de HG e XGA e pequenas regiões formadas por RGI.

Resíduos de galp 4-ligada, juntamente com a ausência do ponto de ramificação 3,4-galp demonstraram o feijão possui galactanos aos invés de AGI em sua composição. A presença de pequenas quantidades de galp 3,6- e 6-ligadas indicaram que os AGII também fazem parte da estrutura da parede celular de feijão.

Grande parte das pectinas neutras são compostas por arabinanos ramificados de peso molecular elevado que não pertencem às cadeias laterais de RGI. Os arabinanos encontrados apresentam conteúdo elevado de araf 2,5- e 3,5-ligadas, confirma a presença de uma estrutura altamente ramificada. A ramificação dos arabinanos é formada por um único resíduo de arabinose ligada nas posições 2 e 3. O perfil de metilações e de peso molecular confirmam que os arabinanos são macromoléculas de elevado peso molecular.

Parte da xilose terminal encontra-se associada a xilogalacturonanos (XGA) e a confirmação foi obtida através do tratamento enzimático com celulase e EPG. Xiloglicanos foram encontrados em quantidades muito pequenas, concentradas nas fração H4 e FBF. Não foram observadas evidências de fucosilação dos xiloglicanos extraídos das frações H4 e FBF nos espectros de massa obtidos com ionização por

electrospray (ESI-MS), embora a fucose estivesse presente em todas as frações estudadas.

As sementes HTC possuem menor quantidade de polissacarídeos solúveis em água e em solução de CDTA e, também, maior quantidade de material insolúvel em água (FIA). Verificou-se a perda de material péctico da parede celular durante a cocção de feijões normais ocorre devido à solubilização e despolimerização, fato não observado em sementes HTC. Os polímeros envolvidos no processo de endurecimento são, principalmente, os solúveis em água e com solução de hidróxido 4M, o que implica na participação dos polissacarídeos da lamela média e da parede primária no fenômeno. Evidências preliminares indicaram que a redução na solubilidade dos polímeros da fração H4 pode estar relacionada com a perda de ramificação dos arabinanos e xiloglicanos, dando origem a estruturas mais lineares e propensas a rearranjar-se dando origem a zonas cristalinas. Com o envelhecimento, os polissacarídeos da parede celular passaram a apresentar maior interação química entre seus componentes tornando-os menos propensos a se despolimerizarem e solubilizarem durante o processo de cocção.

Figura 49: Esquema explicativo, relacionando as alterações nos polissacarídeos da parede celular com o desenvolvimento do HTC. RG, ramnogalacturonano; XGA, xilogalacturonano. O esquema de feijões crus envelhecidos é semelhante ao de crus cozidos e não foi apresentado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, J. M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes - the influence of storage and processing. **J. Food Process. Preserv.**, Trumbull, v. 9, p. 145-169, 1985.
- AGUILERA, J. M., RIVERA, R. Hard-to-cook defect in black beans: hardening rates, water imbibition and multiple mechanism hypothesis. **Food Res. Int.**, Essex, v. 25, p. 101-108, 1992.
- AGUILERA, J.M., STANLEY, D.W. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes - the influence of storage and processing. **J. Food Process Preserv.**, Essex, v. 9, p. 145-169, 1985.
- ALBERSHEIM, P, NEVINS, D. J., ENGLISH, P. D., KARR, A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas chromatography. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 5, p. 340-345, 1967.
- ALBERSHEIM, P. Instability of pectin in neutral solutions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 1, p. 253, 1959.
- BACIC, A., HARRIS, P.J., STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: PREISS, J. **The biochemistry of plants**. Academic Press, San Diego, 1988, p. 297-369.
- BEGNAMI C.N., CORTELAZZO, A.L. Cellular alteration during accelerated aging of French bean seeds. **Seed Sci. & Technol.**, Zurich, v.24, p. 295-303, 1996.
- BERNAL-LUGO, I., CASTILLO, A., LEON, D. F., MORENO, E., RAMÍREZ, J. Does phytic acid influence cooking rate in common beans? **J. Food Biochem.**, Trumbull, v. 15, p. 367-374, 1991.
- BERNAL-LUGO, I., PRADO, G., MORENO, E., RAMÍREZ, J. VELAZCO, O. phytic acid hydrolysis and bean susceptibility to storage induced hardening. **J. Food Biochem.**, Trumbull, v. 14, p. 253-261, 1990.
- BHATTY, R. S. Cooking quality of lentils: The role of structure and composition of cell walls. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 38, p. 376-383, 1990.
- BLAKENEY, A. B.; HARRIS, P. J.; HENRY, R. J.; STONE, B. A. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharides analysis. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 113, p. 291-299, 1983.
- BOURNE, M. C. Texture evaluation of horticultural crops, **HortScience**, Michigan, v. 15, n. 1, p. 51-57, 1980.
- BOURNE, M.C. Physical properties and structure of horticultural crops. In: PELEG, M., BAGLEY., E. B. **Physical properties of foods**. Westport, Avi, Westport, 1983, p.207-228.

- BRADY, J.D., SADLER, I. H., FRY, S.C. Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: its role in cross-link formation. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n.3, p. 349-353, 1998.
- BRESSANI, R. Effect of chemical changes during storage and processing on the nutritional quality of common beans. **Food Nutr. Bull.**, Tokyo, v. 5, n 1, p. 23-34, 1982.
- BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Food Rev. Int.**, New York, v. 9, n. 2, p. 237-297, 1993.
- BRETT, C., WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**, 2nd ed.; Chapman & Hall, London, p. 173-186, p. 222-224, 1996.
- CARNACHAN, S.M., HARRIS, P.J. Ferulic acid is bound to the primary cell walls of all gymnosperm families. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxford, v. 28, p. 865-879, 2000.
- CARPITA, N. C. Hemicellulosic polymers of cell walls of *Zea* coleoptiles. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 72, p. 515-521, 1983.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.
- CARPITA, N. C.; SHEA, E. M. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C.J., MCGINNIS, G. D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Boca Raton, CRC Press, 1989, p. 157-216.
- CARPITA, N. C.; WHITTERN, D. A highly substituted glucuronoarabinoxylan from developing maize coleoptile. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.146, p.129-140, 1986.
- CARPITA, N., MCCANN, M. The cell wall. BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108, 2000.
- CASTELLANOS, J. Z., GUZMÁN-MALDONADO, H., ACOSTA-GALLEGOS, J.A., KELLY, J.D. Effects of hardshell character on cooking time of common beans grown in the semiarid highlands of Mexico. **J. Sci Food Agric.**, London, v. 69, p. 437-443, 1995.
- CHAMP, M.; BRILLOUET, J. M.; ROUAU, X. Non-starchy polysaccharides of *Phaseolus vulgaris*, *Lens esculenta*, and *Cicer arietinum* seeds. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 34, p. 326-329, 1986.
- CHITARRA, M.I.F., CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças – fisiologia e manuseio**. ESAL/FAEPE, Lavras, 1990.

- COSGROVE, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, Palo Alto, v.13, p.171-201, 1997.
- DEL VALLE, J.M., STANLEY, D.W., BOURNE, M.C. Water absorption and swelling in dry bean seeds. **J. Food Process. Preserv.**, Trumbull, v. 16, p. 75-98, 1992.
- DEL VALLE, J.M., STANLEY, D.W. Reversible and irreversible components of bean hardening. **Food Res. Int.**, Essex, v.28, n. 5, p. 455-463, 1995.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A. HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EVANS, A. J.; CHEUNG, P. C. K.; CHEETHAM, N. W. H. The carbohydrate composition of cotyledons and hulls of cultivars of *Lupinus angustifolius* from Western Australia. **J. Sci. Food Agri.**, W. Sussex, p.189-194, 1993.
- FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acid without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v. 197, p. 57-162, 1991.
- FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annu. Rev. Plant Physiol.** Palo Alto, v. 37, p. 165-187, 1980.
- FRY, S. C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. **Planta**, Berlim, v. 157, p. 11-123, 1983.
- FRY, S.C., YORK, W.S., ALBESHEIM, P., DARVILL, A., HAYASHI, T., JOSELEAU, J.P., KATO, Y., LORENCES, E.P., MACLARCHLAN, G.A., MCNEIL, M., MORT, A.J., REID, J.S.G., SEITZ, H.U., SELVENDRAN, R.R.; VORAGEN, A.G.J., WHITE, A.R. An unambiguous nomenclature for Xiloglucan-derived oligosaccharides. **Physiol. Plantarum**, Copenhagen, v. 89, p. 1-3, 1993.
- GARCIA, E. FILISSETTI, T. M. C. C., UDAETA, J. E. M., LAJOLO, F. M. Hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of phenolic compounds and pectates. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 46, p. 2110-2116, 1998.
- GARCIA, E., LAJOLO, F. M. Starch alteration in hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 42. n. 3, p. 612-615, 1994.
- GARCIA, E; LAJOLO, F.; SWANSON, B. G. A comparative study of normal and hard-to-cook brazilian common bean (*Phaseolus vulgaris*): Ultrastructural and histochemical aspects. **Food Struct.**, Chicago, v. 12, p. 147-154, 1993.
- GARCIA-VELA, L. A., STANLEY, D. W. Protein denaturation and starch gelatinization in hard-to-cook beans. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 54, n. 5, p. 1284-86; 1292. 1989.

- GARRUTI, R. S., BOURNE, M. C. Effect of storage conditions of dry bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) on textural profile parameters after cooking. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 50, p. 1067-1071, 1985.
- GIBEAUT, D. M., CARPITA N. C. Clean-up procedure for partially methylated alditol acetate derivatives of polysaccharides. **J. Chromatograph**, Amsterdam, v. 587, n.2, p. 284-287, 1991.
- GOONERATNE, J.; MAJSK-NEWMAN, G.; ROBERTSON, J. A.; SELVENDRAN, R. R. Investigation of factors that affect the solubility of dietary fiber, as nonstarch polysaccharides, in seed tissues of mung bean (*Vigna radiata*) and black gram (*Vigna mungo*). **J. Agric Food Chem.**, Washington, v. 42, n.3, p. 605-611, 1994a.
- GOONERATNE, J.; NEEDS P. W.; RYDEN, P.; SELVENDRAN, R. R. Structural features of cell wall polysaccharides from the cotyledons of mung bean (*Vigna radiata*). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 265, p. 61-77, 1994b.
- HENTGES, D. L., WEAVER, C. M., NIELSEN, S.S. Changes of selected Physical and chemical components in the development of the hard-to-cook bean defect. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 56, n. 2, p. 436-442, 1991.
- HERNÁNDEZ-UZÓN, H.Y., ORTEGA-DELGADO, M.L. Phytic acid in stored common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Food Hum Nutr**, Dordrecht, v. 39, p. 209-221, 1989.
- HINCKS, M. J., STANLEY, D. W. Lignification: evidence for a role in hard-to-cook beans. **J. Food Biochem.**, Trumbull, v. 11, p. 41-58, 1987.
- HINCKS, M. J., STANLEY, D. W. Multiple mechanisms of bean hardening. **J. Food Technol.**, Chicago, v. 21, p. 731-750, 1986.
- HOLBERG, A.I., STANLEY, D. W. Hard-to-cook defect in black beans. Protein and starch consideration. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 35, p. 571-576, 1987.
- HUISMAN, M. M. H.; WEEL, K.G.C., SCHOLS, H. A., VORAGEN A. G. J Xiloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXG-type building units. **Carbohydr. Polym.**, Oxford, v 42, p. 185-191, 2000.
- HUSSAIN, A., BUSHUK, W. Changes in protein eletrophoretic patterns during germination of broad beans (*Vicia faba* L.) with and without hard-to-cook characteristics. **Euphytica**, Wageningen, v. 55, p. 131-139, 1991.
- HUSSAIN, A., WATTS, B.M., BUSHUK, W. Hard-to-cook phenomenon in beans: changes in protein electrophoretic patterns during storage. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 54, n. 5, p. 1367-1368, 1989.
- ILKER, R., SZCZESNIAK, A. S. Structural and chemical bases for texture of plant based foodstuffs. **J. Text. Stud.**, Connecticut, v.21, p. 1-36, 1990

- ISHII, T. Structure and function of feruloylated polysaccharides - review. **Plant Sci.**, v. 127, p. 111-127, 1997.
- JACKMAN, R.L., STANLEY, D.W. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. **Trends Food Sci Technol.**, Cambridge, v. 6, p. 187-194, 1995.
- JONES, P. M. B., BOULTER, D. The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 623-649, 1983.
- KEIJBETS, M.J., PILNIK, W. β -Elimination of pectin in the presence of anions and cations. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 33, p. 359-362, 1974.
- KHALIL, A. H., MANSOUR, E. H. The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. **Food. Chem.**, Oxford, v. 54, p. 177-182, 1995.
- KILMER, O. L., SEIB, P.A., HOSENEY, R.C. Effects of Minerals and apparent phytase activity in the development of the hard-to-cook state of beans. **Cereal Chem.**, St. Paul, v.71, n.5, p. 476-482, 1994.
- LIU K.S., McWATTERS K.H, PHILLIPS R.D. Protein insolubilization and thermal destabilization during storage as related to hard-to-cook defect in cowpeas. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 40, p. 2483-2487, 1992c.
- LIU K.S., PHILLIPS R.D., HUNG Y.C. Development of hard-to-cook defect in cowpeas: role of pectin methylesterase. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 40, p. 949-952, 1992b.
- LIU K.S., PHILLIPS R.D., HUNG Y.C., SHEWFELT R.L., McWATTERS K.H. Hard-to-cook defect in cowpeas - storage-induced and treatment-induced development. **J Food Sci.** Chicago, v 57, n.5, p.1155-1160, 1992a.
- LIU, K. Cellular, biological, and physicochemical basis for the hard-to-cook defect in Legume seeds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, v. 35, n. 4, p. 263-298, 1995.
- LOZOVAYA, V. V.; ZABOTINA, O. A.; WIDHOLM, J. M. Synthesis and turnover of cell wall polysaccharides and starch in photosynthetic soybean suspension cultures. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 111, p. 921-929, 1996.
- MAFULEKA, M.M., OTT, D.B., HOSFIELD, G.L., UEBERSAX, M.A. The role of phytase and lignin in decorticated dry bean (*Phaseolus vulgaris*) hardening during storage. **J. Food Process Pres.**, Trumbull, v.17, n. 1, p. 1-20, 1993
- MARTIN-CABREJAS, M. A., ESTEBAN, R. M., WALDRON, K.W., MAINA, G., GRANT, G., BARDOCZ, S., PUSZTAI, A. Hard-to-cook phenomenon in beans: changes in antinutrient factors and nitrogenous compounds during storage. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 69, p. 429-435, 1995.

- MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- MATTSON, S. The cookability of yellow pear: A colloid-chemical and biochemical study. **Acta Agric. Suecana II**, Stockholm, v. 2, p. 185-231, 1946.
- MCDUGALL, A. J., SELVENDRAN, R.R. Chemistry, architecture and composition of dietary fiber from plant cell walls. In: CHO, S.S., DREHER, M.L. **Handbook of dietary fiber**. Marcel Dekker, New York, 2001, p. 207-218.
- MCLAUGHLIN, M. A.; GAY, M. L. Differentiation of dietary fiber sources by chemical characterization. In FURDA, I., BRINE, C. J.(Ed.), **New developments in dietary fiber**. Plenum, New York, 1990, p. 281-319.
- MCNEIL, M., DARVILL, A. G., FRY, S. C., ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 53, p. 625-63, 1984.
- 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. 1577-1583, 1984.
- NARASIMHA, H. V., SRINIVAS, T., DESIKACHAR, H. S. R. A histological basis for “hard-to-cook” phenomenon in red gram (*Cajanus cajan*) cultivar. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 54, n. 1, p. 125-131, 1989.
- NEVES, T. R M. **Endurecimento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): proteínas da parede celular ricas em hidroxiprolina**. São Paulo, 2000, [Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP].
- O'NEILL, M.A., SELVENDRAN, R.R. Metilation analysis of cell-wall material from parenchimatous tissues of *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 79, p. 115-124, 1980.
- OCKENDEN, I., FALK, D.E., LOTT, J.N.A. Stability of phytate in barley and beans during storage. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 45, p. 1673-1677, 1997.
- OOSTERVELD, A., BELDMAN, G., SCHOLS, H. A., VORANGEN, A. G. J. Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp. **Carbohydr. Res.** Amsterdam, V. 288, p. 143-153, 1996.
- PAREDES-LÓPEZ, O., BARRADAS, I., REYES-MORENO, C. Prediction of the effect of storage conditions on water content and water activity of common beans. **J. Food. Sci.**, Chicago, v. 54, n. 5, p. 1373-1374, 1989.
- PAREDES-LÓPEZ, O., MAZA-CALVINO, E.C., MONTES-RIVERA, R. Effect of the hard-to-cook phenomenon on some physicochemical properties of bean starch. **Starch/Stärke**, Stuttgart, v. 40, n. 6, p. 205-210, 1988.

- PERRONE, P., HEWAGE, C.M., SADLER, I.H., FRY, S.C. N α - and N ϵ -D-galacturonoyl-L-Lysine amides: properties and possible occurrence in plant cell walls. **Phytochemistry**, Oxford, v. 7, p. 1879-1890, 1998.
- PLHAK, L.C., CALDWELL, K.B., STANLEY, D.W. Comparison of methods used to characterize water imbibition in hard-to-cook beans. **J. Food Sci**, Chicago, v. 54, n. 2, p. 326-329, 1989.
- PROSKY, L. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Gaithersburg, v.71, p.1017-1023, 1988.
- REYES-MORENO, C., CÁRABEZ-TREJO, A., PAREDES-LÓPEZ, O., ORDORICA-FALOMIR, C. Physicochemical and structural properties of two bean varieties which differ in cooking time and HTC characteristic. **Lebensm. Wiss. Technol.**, London, v. 27, p. 331-336, 1994.
- REYES-MORENO, C., PAREDES-LÓPEZ, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans - A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.
- REYES-MORENO, C., PAREDES-LÓPEZ, O., BARRADAS, I. A fast laboratory procedure to assess the hard-to-cook tendency of common beans varieties. **Food Chem.**, London, v. 49, p. 187-190, 1994.
- RICHARDSON, J.C., STANLEY, D.W. Relationship of loss of membrane functionality and hard-to-cook defect in aged beans. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 56, n. 2, p. 590-591, 1991.
- RIDLEY, B. L., O'NEILL, M. A., MOHNEN, D. Pectins: structure biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 9290-967, 2001.
- RIVERA, J.A., HOLBERG, A.I., AGUILERA, J.M., PLHAK, L.C., STANLEY, D.W. Hard-to-cook defect in black beans - peroxidase characterization and effect of heat pretreatment and storage conditions on enzyme inactivation. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, Ottawa, v. 22, n. 3, p. 270-275, 1989.
- RODRIGUEZ, F. M., MENDOZA, E. M. Physicochemical basis for Hardseededness in mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 38, p. 29-32, 1990.
- ROLSTON, M.P. Water impermeable, seed dormancy. **Bot. Rev.**, New York, v. 44, n. 3, p. 365-396, 1978.
- RYDEN, P.; SELVENDRAN, R. Cell-wall polysaccharides and glycoproteins of parenchymatous tissues of runner bean (*Phaseolus coccineus*). **Biochem. J.**, London, v. 269, p. 393-402, 1990.

- SABARENSE, C.M., MENDEZ, M.H.M., DERIVI, S.C.N., SILVA, M.F. Influência das condições de armazenamento de feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) no endurecimento, na fração fibra da dieta e na digestibilidade. **Rev. Bras. Farm.**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 37-42, 1995.
- SAEMAN, J.F., MOORE, W.E., MITCHELL, R.L., MILLETT, M.A. Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **TAPPI**, New York, v. 37, p. 336-339, 1954.
- SEFA-DEDEH, S., STANLEY, D.W., VOISEY, P.W. Effect of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of cowpea (*Vigna unguiculata*). **J. Food Sci.**, Chicago, v.43, p. 1832-1838, 1978.
- SEFA-DEDEH, S., STANLEY, D.W., VOISEY, P.W. Effect of storage time and conditions on the hard-to-cook defect in cowpeas (*Vigna unguiculata*). **J. Food Sci.**, Chicago, v.44, p. 790-796, 1979.
- SELVENDRAN, R. R.; O'NEILL, M. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Methods Biochem. Anal.**, New York, v.32, p. 25-153, 1987.
- SHEHATA, A. M. E. Hard-to-cook phenomenon in legumes. **Food Rev. Int.**, New York, v. 8, n. 2, p. 191-221, 1992.
- SHOMER, I., PASTER, N., LINDNER, P., VASILIVER, R. The role of cell wall structure in the hard-to-cook phenomenon in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Struct.**, Chicago, v. 9, p. 139-149, 1990.
- SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 9-23, 1993.
- SILVA, C.A. **Influência da estrutura de polissacarídeos pécticos de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja.** Campinas, 2001a [Dissertação de mestrado, IB / UNICAMP].
- SILVA, C.O. **Papel da β -galactosidase no mecanismo de degradação do xiloglicano de parede celular durante a mobilização de reserva em cotilédones de *Copaifera langsdorffii*** Campinas, 2001b [Dissertação de Mestrado, IB / UNICAMP].
- SOMMER-KNUDSEN, J., BACIC, A., CLARKE, A.E. Hidroxyproline-rich plant glycoproteins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n.4, p. 483-497, 1998.
- SRISUMA, N., HAMMERSCHMIDT, R., UEBERSAX, M. A., RUENGSSAKULRACH, S., BENNINK, M.R., HOSFIELD, G.L. Storage induced changes of phenolic acids and the development of hard-to-cook in dry beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Seafarer). **J. Food Sci.**, Chicago, v. 54, n. 2, p. 311-318, 1989.

- SRISUMA, N., RUENGSSAKULRACH, S., UEBERSAX, M.A., BENNINK, M.R., HAMMERSCHMIDT, R.. Cell wall polysaccharides of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 39, p. 855-858, 1991.
- STANLEY, D. W. A possible role for condensed tannins in bean hardening. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v. 25, p. 187-192, 1992
- STANLEY, D. W., AGUILERA, J. M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes – the influence of structure and composition. **J. Food Biochem.**, Trumbull, v. 09, p. 277-323, 1985.
- STANLEY, D. W., WU, X., PLHAK, L.C. Seed coat effects in cooked reconstituted bean texture. **J. Texture Stud.**, Westpot, v. 20, n. 04, p. 419-429, 1989.
- STOLLE-SMITS, T., BEEKHUIZEN, J.G., VAN DIJK, C., VORAGEN, G.J., RE COURT, K. Cell wall dissolution during industrial processing of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric Food Chem.**, Washington, v. 43, p. 2480-2486, 1995.
- TALBOTT, L. D.; RAY, P. M. Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides. **Plant Physiol.**, Rockville, v.98, p. 357-368, 1992.
- UDAETA, J.E.M. **Comportamento de ácidos hidroxicinâmicos e polissacarídeos no endurecimento pós-colheita de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.)**. São Paulo, 1998, [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP].
- VARRIANO-MARSTON, E., JACKSON, G. M. Hard-to-cook phenomenon in beans: structural changes during storage and imbibition. **J. Food Sci**, Chicago, v. 46, p. 1379-1385, 1981.
- VINDIOLA, O.L., SEIB, P.A., HOSENEY, R.C. Accelerated development of the hard-to-cook state in beans. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 31, n. 8, p. 538-552, 1986.
- VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentals of biochemistry** . John Wiley & Sons, New York ,1998.
- WALDRON, K.W., SMITH, A.C., PARR, A.J., NG, A., PARKER, M.L. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. **Trends Food Sci Technol.**, Cambridge, v.8, p.213-221, 1997.
- WEIGHTMAN, R.M., RENARD, C.M.G.C., GALLANT, D.J., THIBAUT, J.F. Structure and properties of the polysaccharides from pea hulls – II. Modification of the composition and physico-chemical properties of pea hulls by chemical extraction of the constituents polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 26, p. 121-128, 1995.
- WILKINSON, C., DIJKSTERHUIS, G. B., MINEKUS, M. From food structure to texture. **Trends Food Sci Technol.**, Cambridge, v. 11, p. 442-450, 2000.

YORK, W.S., DARVILL, A.G., MCNEIL, M., STEVENSON, T.T., ALBERSHEIM, P. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. **Method Enzymol**, San Diego, v. 118, p. 3-40, 1986.

ZHANG, M., YOSHIYAMA, M., NAGASHIMA, T., NAKAGAWA, Y., YOSHIOKA, T., ESASHI, Y. Aging of soybean seeds in relation to metabolism at different relative humidities. **Plant Cell. Physiol.**, Kyoto, v. 36, n. 7, p. 1189-1195, 1995.

Figura A 1: Cromatografia de exclusão molecular da fração solúvel em água (FSA) e em CDTA (FCDTA) de feijões Carioca –Pérola. Eluente tampão acetato de sódio 30mM, pH5, 20mM de azida e 125mM NaCl. **A.T.**, açúcares totais, **AU**, ácidos urônicos. V_e , 160mL; V_0 , 20 mL.

Figura A 2: rendimento de fração insolúvel em água (FIA) e da fração polissacarídica solúvel em água (FSA) de feijões novos e envelhecidos em amostras cruas e cozidas.

Tabela A 1: Distribuição de peso molecular das frações pécticas da parede celular de feijão cru e cozido obtidas através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose CL4B. **FSA**, fração solúvel em água; **FCDTA**, fração solúvel em solução de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em hidróxido de sódio 0,01; 0,5; 1,0 e 4,0 M.

Frações	MDa			
	Cru		Cozido	
	Envelhecido	Novo	Envelhecido	Novo
FSA	3,51	2,17	3,51	2,99
FCDTA	3,51	3,51	4,83	3,51
H0,01	3,51	2,99	2,99	2,99
H0,5	2,99	2,99	2,55	3,51
H1	2,55	2,99	2,99	2,99
H4	0,71	1,58	0,83	0,60

Figura A 3: Perfil de eluição dos polímeros provenientes das enzimas utilizadas na extração da parede celular de feijão.

Figura A 4: Perfil de açúcares dos polímeros encontrados nas enzimas utilizadas na extração de parede celular de feijão. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, AU, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n=3).

Figura A 5: Composição de açúcares dos polímeros obtidos da fração solúvel em água (FSA) de feijões novos e envelhecidos, crus e após cocção. Valores apresentados como porcentagem de açúcar presente nos polissacarídeos. Os polímeros obtidos após a separação em coluna de troca aniônica foram analisados quanto o conteúdo de açúcares. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n=3).

Figura A 6: Composição em carboidratos do FIA e da FSA da casca de feijões novos e envelhecidos. Valores apresentados em µg de açúcar por mg de polissacarídeo. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n ≥ 3).

Figura A 7: Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédono de feijões crus novos e envelhecidos. Valores apresentados em µg de açúcar por mg de polissacarídeo. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n ≥ 3).

Figura A 8: Composição em carboidratos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de cotilédono de feijões cozidos novos e envelhecidos. Valores apresentados em µg de açúcar por mg de polissacarídeo. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n ≥ 3).

Figura A 9: Perfil de fracionamento da fração insolúvel em água (FIA) do cotilédono de feijões novos e envelhecidos. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose; **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; **FCDTA**, fração solúvel em solução quelante de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em NaOH 0,01-4M; **Resíduo**, resíduo rico em celulose. Composição dada em porcentagem molar p/p. (n=3)

Figura A 10: Relação entre monossacarídeos da fração insolúvel em água de feijões envelhecidos, descontado o conteúdo de glicose. Valores apresentados como porcentagem relativa. **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose; **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; (n=3).

Tabela A 2: Composição de açúcares e polissacarídeos dos polímeros contidos na fração solúvel em água (FSA) e na fração insolúvel em água (FIA) da parede celular da casca de feijão.

Fração	Rendimento o (%)	Cel (%)	Açúcares Neutros (%)							AU (%)
			Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	
FSA	71,10	-	3,6	0,1	38,0	11,6	9,7	10,8	5,3	21,0
FIA	3,41	11,5	2,4	0,4	22,3	35,3	0,2	12,4	4,0	13,9

FSA; fração solúvel em água; **FIA**, material celular, que corresponde aos polímeros insolúveis em água; **Ram**, ramno; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose; **AU**, ácidos urônicos; **Cel**, glicose proveniente da celulose; **FCDTA**, fração solúvel em solução quelante de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em NaOH 0,01-4M. Composição dada em porcentagem molar p/p. (n=3)

Tabela A 3: Composição de monossacarídeos da fração solúvel em água (FSA) e da fração insolúvel em água (FIA) de feijões novos e envelhecidos crus e cozidos.

Amostra	Açúcares (%)								Celulose (%)
	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	AU	
FSA - Cru									
Novo	1,8±0,0 ^a	0,6±0,1 ^a	42,1±2,9 ^a	11,2±0,4 ^a	13,3±0,9 ^a	11,1±0,7 ^{ab}	7,1±0,2 ^a	12,7±0,01 ^a	-
Envelhecido	1,7±0,2 ^a	0,6±0,1 ^a	38,6±5,4 ^a	11,4±1,0 ^a	15,5±1,5 ^a	12,5±0,7 ^a	9,0±0,2 ^b	10,6±0,01 ^b	-
FSA - Cozido									
Novo	1,9±0,2 ^a	0,6±0,1 ^a	45,3±3,9 ^a	11,6±1,4 ^a	9,2±1,2 ^b	10,5±1,1 ^b	5,7±0,6 ^c	15,3±0,01 ^c	-
Envelhecido	2,1±0,01 ^a	0,4±0,2 ^a	44,4±1,8 ^a	14,4±0,3 ^b	9,9±1,5 ^b	11,4±0,3 ^b	5,7±0,3 ^c	11,6±0,01 ^d	-
FIA - Cru									
Novo	2,4±0,5 ^a	0,8±0,1 ^a	56,4±8,4 ^a	12,9±0,9 ^a	0,5±0,1 ^a	5,5±0,7 ^a	3,4±0,2 ^a	6,6±0,01 ^a	11,5±0,7 ^a
Envelhecido	1,9±0,1 ^a	0,7±0,01 ^a	50,5±2,8 ^a	10,5±0,1 ^b	0,8±0,01 ^b	5,0±0,2 ^a	2,9±0,1 ^b	8,4±0,01 ^b	19,3±3,8 ^b
FIA - Cozido									
Novo	2,0±0,1 ^a	0,7±0,01 ^a	44,9±5,2 ^{ab}	9,4±0,6 ^c	0,4±0,01 ^c	4,5±0,3 ^a	6,0±0,5 ^c	8,7±0,01 ^c	25,4±1,3 ^c
Envelhecido	1,4±0,01 ^b	0,5±0,1 ^b	38,6±3,7 ^b	7,1±0,7 ^d	0,7±0,01 ^d	4,6±0,6 ^a	25,5±1,7 ^d	4,8±0,01 ^d	18,2±2,6 ^b

A média entre os dados do mesmo grupo de dados, seguida de letra diferente são significativamente diferentes ($n \geq 3$)

Figura A 11: Perfil de açúcares das frações obtida do FIA de feijões novos e envelhecidos. Valores apresentados como μg de açúcar por mg de polissacarídeo. **FCDTA**, fração solúvel em solução de CDTA; **H0,01-H4**, frações solúveis em hidróxido de sódio 0,01; 0,5; 1,0 e 4,0 M. Açúcares: **Ram**, ramnose; **Fuc**, fucose; **Ara**, arabinose; **Xil**, xilose; **Man**, manose; **Gal**, galactose; **Glc**, glicose, **AU**, ácidos urônicos; **Resíduo**, resíduo rico em celulose ($n = 3$).

Figura A 12: Perfil de cromatografia de massa por electrospray (ESI), das frações FBF(A) e H4(B), tratadas com celulase. Fração contendo fragmentos de xiloglicano. $[M+Na]^+$: 1) 1085; 2) 1223; 3) 1247; 4) 1308 5) 1388; 5) 1543; 6) 1543.

Figura A 13: Perfil de cromatografia de massa por electrospray (ESI), das fração H4(B), tratadas com celulase. Fração contendo fragmentos de xiloglicano. $[M+Na]^+$: 1) 1085; 2) 1223; 3) 1247; 4) 1308 5) 1388; 5) 1543; 6) 1543