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

“FENÔMENO DE ENDURECIMENTO DE FEIJÕES
(*Phaseolus vulgaris* L): POLISSACARÍDEOS DA
PAREDE CELULAR”

TÂNIA MISUZU SHIGA

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientadora:
Tullia M.C.C. Filisetti

São Paulo
1998

TÂNIA MISUZU SHIGA

FENÔMENO DE ENDURECIMENTO DE FEIJÕES (*Phaseolus vulgaris* L.): POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Comissão Julgadora:

Prof.ª Dr.ª Tullia M.C.C. Filisetti
Presidente / Orientadora

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo
1º. Examinador

Prof. Titular Franco Maria Lajolo
2º. Examinador

São Paulo, 01 de julho de 1998

Para aquela que infelizmente não se encontra mais aqui, mas que sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Agradecimentos especiais à minha orientadora Tullia M.C.C. Filisetti, por sua amizade, apoio e orientação desde a minha iniciação científica.

À Maria Oriana D.C. Reyes-Figueroa pela amizade, inúmeras caronas e acolhida nos meus primeiros dias de laboratório.

Para Fábio, meu irmão e para as amigas Telma e Jicela, Renata e Selene que contribuíram com o incentivo e amizade constantes e em especial para a amiga Marijara por sua amizade, apoio contínuo e inúmeras caronas.

Para o amigo Paulo, pela ajuda e amizade dispensada nos momentos difíceis.

Agradecimentos especiais para Lúcia, Isaura, Márcia, Benê, Elaine, Ângela, Mônica, Isabel e Moema, sem as quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Para os professores Michele Vittolo e Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica por terem gentilmente cedido o liofilizador durante a realização do trabalho e para Gledson pelo auxílio na liofilização.

Para todos os membros do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo.

Agradecimento especial para o professor, doutor Artemio Plana Fattori e todos os membros da Estação Meteorológica do Instituto Astronômico e Geofísico, por fornecerem gentilmente os dados de temperatura e umidade do ar e para o Instituto Agronômico de Campinas, por fornecerem gentilmente os feijões utilizados no experimento.

Finalmente, para os professores Angelo L. Cortelazzo, Beatriz R. Cordenunsi e Ursula M. Lanfer Marquez pelas correções feitas no trabalho.

SUMÁRIO

1.- INTRODUÇÃO	06
1.1.- Hardshell	07
1.2.- Hard-to-cook	09
1.2.1.- Principais alterações apresentadas por feijões <i>hard-to-cook</i> e os problemas associados à ele.	10
1.2.2.- Alternativas de aproveitamento de sementes <i>hard-to-cook</i> .	12
1.2.3.- Mecanismos propostos para explicar o fenômeno <i>hard-to-cook</i>	13
1.2.3.1- O papel dos compostos fenólicos e a teoria da lignificação.	13
1.2.3.2.- Reações enzimáticas e não enzimáticas envolvidas no processo de endurecimento de leguminosas.	15
1.2.3.3.- Teorias envolvendo os materiais de reserva como o amido e a proteína, no processo de endurecimento.	22
1.3.- Polissacarídeos da parede celular e seu papel no endurecimento.	24
2.- OBJETIVO:	27
3.- MATERIAIS	28
3.1.- Sementes utilizadas	28
3.2.- Reagentes utilizados	28
4.-MÉTODOS	29
4.1.- Armazenamento das Sementes	29
4.1.1.-Tempo de armazenamento	30
4.2.- Umidade	30

4.3.- Germinação das sementes	30
4.4.- Tempo de cocção	31
4.5.- Isolamento da parede celular	31
4.5.1.- Preparo das amostras	31
4.5.2.- Tratamento enzimático do cotilédone e do tegumento.	32
4.5.3.- Tratamento químico do cotilédone	32
4.5.4.- Tratamento químico do tegumento.	33
4.6.- Caracterização química da parede celular	33
4.6.1.- Determinação de proteínas.	35
4.6.2.- Determinação de ácidos urônicos.	36
4.6.3.- Determinação de açúcares neutros.	37
4.6.3.1.- Hidrólise dos polissacarídeos.	37
4.6.3.2.- Preparo de derivados de acetato de alditol	37
4.6.3.3.- Cromatografia a gás dos açúcares neutros.	38
4.6.4.- Fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone	41
4.7.- Esquema do método de extração fracionamento e caracterização da parede celular.	43
5.- RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1.- Umidade, germinação e tempo de cocção das sementes	45
5.2.- Caracterização química do feijão controle	46
5.3.- Análise dos rendimentos da parede celular insolúvel (PCI), solúvel (PCS) e amido residual (AMR) do cotilédone e tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.	52

5.4.- Caracterização química da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.	56
5.5.- Caracterização química da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.	63
5.6.- Polissacarídeos obtidos do fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.	68
5.7.- Caracterização química dos polissacarídeos obtidos do fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.	71
6.- CONCLUSÕES	79
7.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8.- RELAÇÃO DE TABELAS E FIGURAS	97
8.1.- Figuras	97
8.2.- Quadros	99
8.3.- Tabelas	100
9.- RESUMO	103
10.- SUMMARY	104
11.- ANEXOS	105

1.- INTRODUÇÃO

As sementes de leguminosas são consideradas como uma fonte importante de energia e nutrientes para a população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. Os feijões fornecem proteínas, carboidratos complexos (amido e fibra alimentar) ácidos graxos poliinsaturados (linoleico e linolênico), vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina e vitamina B6) e minerais (Ca, Fe, Cu Zn, P, K, e Mg). (REYES-MORENO e PAREDES-LÓPEZ, 1993; BRESSANI, 1993).

Existem entretanto, vários aspectos nutricionais, bioquímicos, tecnológicos e agronômicos que limitam sua utilização. Por exemplo, os feijões possuem fatores antinutricionais como compostos fenólicos, lectinas, inibidores enzimáticos, fitatos e fatores de flatulência que prejudicam a absorção dos nutrientes e podem causar desconforto físico às pessoas que os consomem. Estes problemas são facilmente contornados através do processamento adequado, que elimina grande parte destes compostos. Sabe-se, também, que os feijões são deficientes em aminoácidos sulfurados. Felizmente, sua associação a algum tipo de cereal supre adequadamente essa deficiência (BRESSANI, 1993).

Além disso, ocorrem muitas perdas no caminho entre o campo e a mesa do consumidor. Estas perdas podem se dar durante o processo de colheita, transporte e armazenamento dos feijões. Por exemplo, o ataque de insetos, pássaros, fungos e roedores compromete parte da produção de sementes quando estas encontram-se no campo. Outra parcela considerável de sementes também é perdida devido ao manuseio e processamento inadequado (BRESSANI, 1982; GARCIA, 1990). Durante os longos períodos de armazenamento, freqüentemente sob condições inadequadas, ocorre o desenvolvimento de um defeito textural que causa inúmeros prejuízos econômicos e nutricionais.

Quando as sementes são submetidas à temperatura e umidade elevadas adquirem o defeito textural conhecido como *hard-to-cook* (HTC), que as tornam resistentes à cocção, necessitando de um período prolongado de cozimento para atingir uma textura adequada. Neste caso, as perdas

econômicas advém do maior gasto de energia e da perda de nutrientes em consequência do longo tempo de aquecimento à qual as sementes são submetidas durante o seu preparo (BRESSANI, 1982).

Segundo Bressani (1993) a maciez das sementes é considerada um atributo de qualidade muito importante. Os feijões que apresentam este tipo de defeito produzem caldo ralo, escuro e grãos com textura arenosa, contribuindo para a diminuição da aceitação do produto por parte do consumidor. Além disso, este fenômeno não se limita somente aos feijões, tendo sido observado em outras leguminosas como na soja (SAIO, 1976), no feijão de corda (SEFA-DEDEH e col., 1978, 1979) e na lentilha (BHATTY, 1990). Dois tipos distintos de defeito textural estão bem documentados, o já comentado *hard-to-cook* (HTC), e o *hardshell* (HS). Ambos os casos, resultam em sementes difíceis de cozinhar.

1.1.- Hardshell

Em alguns casos as sementes viáveis falham em germinar por não se embeberem de água. Isto ocorre mesmo quando as condições do meio são aparentemente favoráveis para a germinação. Essas sementes que não são capazes de embeber-se são comumente denominadas impermeáveis ou *hard seeds* (sementes duras). Elas permanecem duras, ao contrário das sementes que se embebem de água e tornam-se macias durante a germinação (ROLSTON, 1978). Este fenômeno, recentemente denominado *hardshell* (HS), principalmente em sementes comestíveis, é causado por uma característica física das sementes (VARRIANO-MARSTON, JACKSON, 1981; CASTELLANOS e col., 1995; STANLEY e AGUILERA, 1985; LIU, 1995, BRESSANI, 1993). Isto ocorre porque os feijões HS possuem cascas mais grossas com células paliçádicas mais altas e compactas (RODRIGUEZ e MENDOZA, 1990) que as tornam impermeáveis à água (GARCIA, 1991; CASTELLANOS e col., 1995).

O desenvolvimento deste fenômeno tem sido atribuído à fatores genéticos e ambientais. Segundo revisão feita por Rolston (1978), isto ocorre normalmente em localidades altas e de clima frio, onde o ar é naturalmente

seco. Rolston (1978) também cita um trabalho de Lebedeff (1947) em que se induz o desenvolvimento do fenômeno em feijões através do armazenamento das sementes em condições de baixa umidade. Castellanos e col. (1995), também, concordam que esta característica seria o resultado da adaptação das sementes à climas semi-áridos, sendo considerada própria das plantas provenientes desses locais. Além disso, sabe-se que cascas impermeáveis são responsáveis pelo aumento no tempo de vida de muitas sementes, habilitando-as a sobreviver quando ingeridas e favorecendo, assim, a sua dispersão por pássaros e animais. Contudo, apesar da longevidade ser um fato freqüente nestes casos, nem sempre encontra-se associada com estas características (ROLSTON, 1978).

Segundo os trabalhos realizados por Sefa-Dedeh e Stanley (1979), a absorção de água também depende de características anatômicas da semente, como a espessura da casca, tamanho do hilo e sua composição (como o teor de proteína da semente).

A presença de cascas impermeáveis provoca sérios inconvenientes no preparo dos feijões, tanto no âmbito caseiro como no industrial. Isto ocorre principalmente porque o cozimento das sementes dá-se mediante processo hidrotérmico onde há gelatinização do amido, desnaturação protéica e solubilização dos polissacarídeos da parede celular causando rompimento dos tecidos, amaciamento e produção de aroma (SEFA-DEDEH e col., 1979). Quando ocorre limitação da entrada de água na célula, limita-se a desnaturação da proteína e a gelatinização do amido, causando perda de pressão de turgor, redução na separação das células e, conseqüentemente, endurecimento das sementes.

Neste tipo de defeito textural, a remoção e escarificação da casca, antes da maceração das sementes, faz com haja um embebedimento adequado do cotilédono, levando ao seu amaciamento. Além disso, tem-se conseguido eliminar a maioria das variedades de feijão com casca impermeável através de melhoramento genético (STANLEY e AGUILERA, 1985, VINDIOLA, 1986).

Novas formas de aproveitamento destas sementes, também, foram estudadas para reduzir o desperdício. Através do descascamento, produção de isolados de amido e proteína e escarificação das sementes, por exemplo, pode-se aproveitar as sementes que apresentam este tipo de defeito. Além disso, todo tipo de feijão, assim como as demais leguminosas, também estão sujeitas a adquirir outro tipo de defeito textural, conhecido como *hard-to-cook* (HTC) (VINDIOLA e col., 1986).

1.2.- Hard-to-cook

As alterações mais visíveis no fenômeno conhecido como *hard-to-cook* (HTC) são o escurecimento da casca e a grande resistência ao amaciamento por cocção. Acredita-se que reações complexas são desencadeadas no interior das sementes durante os períodos prolongados de armazenamento. Inúmeras alterações envolvendo enzimas, membrana e parede celular e materiais de reserva como amido e proteína dão início ao processo de endurecimento conhecido como HTC. Temperatura e umidade elevadas de armazenamento aceleram e contribuem para o desenvolvimento dessas reações. Neste caso, são os países tropicais que apresentam ambiente propício para o desenvolvimento desse fenômeno, tornando-o um problema de difícil solução.

O grau de endurecimento e a rapidez em que se desenvolve o fenômeno HTC, também podem estar associados ao clima e ao solo no qual os feijões são cultivados, bem como às características intrínsecas da semente. Paredes-López e col. (1989), por exemplo, constataram que os feijões apresentavam maior grau de dureza e adquiriam o HTC com maior rapidez quando as sementes eram provenientes de plantas cultivadas em solo rico em íons bivalentes.

O fenômeno conhecido como HTC está associado às várias alterações que ocorrem principalmente no cotilédone, causando grande resistência das sementes ao amaciamento por cocção (CASTELLANO e col., 1995; STANLEY e AGUILERA, 1985; LIU, 1995). Neste caso, não são as cascas que atuam como uma barreira entre o cotilédone e a água de maceração

como ocorre em feijões HS. As sementes HTC absorvem água durante o processo de maceração, mas não atingem o grau de maciez adequado mesmo após um tempo de cocção razoável. Portanto, muitos pesquisadores concluíram que o problema era provocado pela insolubilização dos componentes da parede celular e lamela média e/ou à alterações ocorridas com os materiais de reserva (amido e proteína). O principal argumento contido nesta teoria (como veremos adiante) é que, com a insolubilização dos componentes da parede, limita-se a entrada de água nas células impedindo a gelatinização do amido e a desnaturação da proteína, reduzindo, dessa forma, a pressão de turgor que força uma célula para longe da outra. A insolubilização da lamela média, neste caso, também contribuiria com o fenômeno aumentando a coesão entre as células.

Por outro lado, Vindiola e col. (1986) afirmaram que deixando as sementes macerar em água e cozinhando-as por quinze minutos, já haveria quantidade de água suficiente no interior das células para que houvesse gelatinização do amido e desnaturação das proteínas. Concluíram com isso, que a textura arenosa nos feijões duros não se devia ao amido não gelatinizado ou à proteína que não foi desnaturada. Sugeriram então, que a limitação de entrada de água nas células não era a principal causa do aumento no tempo de cocção como Varriano-Marston e Jackson (1981) haviam afirmado. Os mesmos acreditam que o amido e a proteína no interior das células não contribuem com o amaciamento e que este se dá pela separação das células durante o cozimento.

1.2.1.- Principais alterações apresentadas por feijões *hard-to-cook* e os problemas associados a eles.

A qualidade da semente é determinada por vários fatores, tais como, aceitabilidade por parte do consumidor (aspecto regional e cultural), características de maceração, cocção e valor nutritivo (BRESSANI, 1993).

Os consumidores procuram feijões que se embebam e cozinham adequadamente num período curto de tempo. Por outro lado, os agricultores desejam variedades resistentes às pragas e ao desenvolvimento de HTC,

que germinem e cresçam rapidamente produzindo quantidade abundante de sementes. Outros aspectos, como o tipo de semente, tamanho, cor, brilho e formato também são atributos importantes, contudo, são de difícil avaliação pois dependem muito da formação cultural da população (REYES-MORENO e PAREDES-LÓPEZ, 1993; BRESSANI, 1993). A textura, entretanto, é sem sombra de dúvida, o fator determinante na qualidade dos feijões, visto que a maciez é um atributo procurado em qualquer tipo de semente comestível.

O feijão HTC apresenta baixa aceitabilidade perante o consumidor devido à sua pobre qualidade textural e organoléptica. As sementes que apresentam este defeito têm em geral, coloração mais escura e textura arenosa após o cozimento. O caldo resultante de sua preparação é ralo e igualmente escuro, tornando-o indesejável tanto para o processamento industrial como para o consumo caseiro. Estes aspectos são importantes, principalmente quando consideramos que a textura, bem como a produção de um caldo grosso (GARCIA e LAJOLO, 1991) e claro, de aroma e sabor agradável são considerados atributos importantes de qualidade por parte dos consumidores latino-americanos (BRESSANI, 1993).

Outro aspecto prejudicial encontrado em sementes com este defeito é a menor biodisponibilidade de seus nutrientes em relação aos feijões macios (REYES-MORENO e PAREDES-LÓPEZ, 1993, SABARENSE e col., 1995). Sabe-se que feijões HTC apresentam decréscimo na qualidade e na digestibilidade de sua proteína em relação aos feijões normais (BRESSANI, 1982; SABARENSE e col., 1995). Devido ao longo tempo de cocção necessário para atingir a textura adequada, ocorre a perda de lisina mediante o seu comprometimento na reação de Maillard (BRESSANI, 1982). Além disso Garcia e Lajolo (1994) verificaram que o feijão duro apresenta amido com grau de cristalinidade maior sendo, portanto, mais difícil de ser atacado pelas enzimas.

Martin-Cabrejas e Esteban (1995) verificaram que feijões HTC tinham quantidades menores de inibidores de α -amilase e maiores de lectinas, contudo, as quantidades de inibidores de tripsina e quimotripsina eram as mesmas quando comparadas ao feijão controle. Observaram,

também, que nos feijões HTC a extração de proteínas com dodecilssulfato de sódio (SDS) era menor e que ocorria uma redução na quantidade de proteínas extraída pela água.

Apesar dos fatores antinutricionais como lectinas, inibidores de protease e de α -amilase serem inativados pelo tratamento hidrotérmico, Aguilera e Rivera (1992) observaram que a digestibilidade dos feijões cozidos ainda assim era baixa, principalmente quando comparada com a de feijões controle. Sabarense e col. (1995) também verificaram que feijões endurecidos apresentavam menor digestibilidade de sua proteína em relação a feijões controle. Dessa forma, verificou-se que a digestibilidade do amido, bem como a da proteína em feijões HTC é menor do que em feijões não endurecidos.

1.2.2.- Alternativas de aproveitamento de sementes *hard-to-cook*

A extrusão e a produção de isolados protéicos, por exemplo, estão sendo consideradas como alternativas para o aproveitamento de feijões que apresentam este defeito textural (STEEL, 1995; STANLEY e col., 1989). Vários estudos têm sido feitos para tentar aproveitar os feijões HTC. Por exemplo, Hung (1995) estudou as propriedades físico-químicas e microbiológicas de feijões HTC no preparo de *akara* (ou acarajé, como é conhecido comumente no Brasil) para avaliar os efeitos dos longos períodos de armazenamento sobre o processamento deste alimento. Paredes-López e col. (1990) estudaram a viabilidade da inclusão de feijões HTC no preparo de alimentos e avaliaram sensorialmente *tempeh*, *atoles* e *cookies* produzidos com feijões HTC. São várias as propostas apresentadas para evitar o desperdício das sementes HTC. Contudo, a solução ideal seria evitar o aparecimento deste fenômeno através da produção de variedades resistentes que demorassem à adquirir este defeito. Para tal, necessita-se entender e conhecer melhor a composição da parede celular, as causas do endurecimento e os mecanismos que levam à ele.

1.2.3.- Mecanismos propostos para explicar o fenômeno *hard-to-cook*

Há várias hipóteses que tentam explicar o fenômeno do endurecimento (HTC) causado por temperatura e umidade elevadas. A maioria das hipóteses baseiam-se nas possíveis alterações ocorridas na parede celular e lamela média (envolvendo pectinas e compostos fenólicos) e nos materiais de reserva (amido e proteína).

Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura não apresentam metodologia padronizada para induzir o fenômeno de endurecimento das sementes (Bressani, 1993), sendo, portanto, difícil de compará-los entre si. Por exemplo, existem trabalhos em que o endurecimento das sementes foi provocado através de maceração em tampões aquecidos, outros empregam calor nas sementes secas acondicionadas em sacos plásticos, outros utilizam calor seco diretamente sobre as sementes, outros usam atmosfera controlada colocando as sementes em dessecadores contendo soluções salinas e outros submetem as sementes à maceração seguida de congelamento para que haja rompimento das células e extravasamento do seu conteúdo. Qualquer um dos tratamentos mencionados leva ao endurecimento dos grãos. Existem, também, diferenças na padronização dos tempos e das temperaturas empregadas no processo de envelhecimento, na forma como se avalia o grau de dureza (usando texturômetros, cozedores de Mattson ou mesmo a pressão dos dedos) e nas metodologias empregadas para determinar as alterações ocorridas. Muitas vezes, os trabalhos também apresentam resultados contraditórios, tornando o seu estudo ainda mais complicado.

1.2.3.1- 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 que são ricas nesta substância) mediada pela polifenoloxidase, e pela formação de ligações cruzadas entre os compostos fenólicos e as proteínas da parede das células dos cotilédones (VARRIANO-MARSTON e JACKSON, 1981). 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 passíveis de serem extraídos. Verificaram com isso que os compostos fenólicos eram menos extraídos à medida que aumentava o tempo de armazenamento e concluíram que o decréscimo na quantidade de fenóis extraídos devia-se ao comprometimento dos mesmos com a polimerização e lignificação. Srisuma e col. (1989), contudo, relacionaram o aumento do conteúdo de fenóis livres com o endurecimento da casca bem como do cotilédono. Este aumento seria resultado da síntese ou da 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) acreditam 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 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 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 e col. (1993) também verificaram que havia correlação entre o aumento no conteúdo de lignina e o endurecimento de feijões vermelho, mas não verificaram o mesmo em feijões

brancos. Contudo, Rivera e col. (1989) estudaram a eficácia do tratamento com calor seco para inativar a peroxidase e sua utilidade na conservação das sementes durante o armazenamento e verificaram que a inativação da peroxidase por si só não impede o desenvolvimento do HTC.

Stanley (1992) determinou o conteúdo de taninos em amostras de feijão macias armazenadas 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 com o tempo. Deduziram então, que isto se devia à condensação dos taninos no tegumento e/ou migração destes para o cotilédono onde se ligariam aos componentes macromoleculares da parede e lamela média, causando o HTC. Concordando com a teoria de Stanley (1992), o trabalho de Reyes-Moreno e col. (1994) demonstra que o envelhecimento reduz significativamente o conteúdo de taninos das cascas ao passo que este aumenta no cotilédono. Há contudo, vários trabalhos que contradizem estas teorias e que são mencionados numa revisão feita por Liu (1995). Além disso, Srisuma e col. (1989) não verificaram qualquer alteração no conteúdo de lignina nos feijões estudados.

1.2.3.2.- Reações enzimáticas e não enzimáticas envolvidas no processo de endurecimento de leguminosas.

De acordo com alguns autores, durante o envelhecimento o calor e a umidade elevada causariam a ativação das enzimas presentes no cotilédono, desencadeando inúmeras reações (HINCKS e STANLEY, 1986; LIU, 1995). Estas reações contribuiriam com o endurecimento provocando alterações no meio extra celular, danificando membranas e alterando a estrutura dos componentes da parede celular e lamela média. Varriano-Marston e Jackson (1981) verificaram que feijões envelhecidos apresentavam várias alterações ultra-estruturais e perda da integridade do plasmalema. Afirmaram, também, que estas alterações poderiam estar associadas com alterações bioquímicas provocadas pela ativação de

diversas enzimas. Stanley e Aguilera (1985) também atribuem às enzimas parte da responsabilidade no processo de endurecimento das sementes. Hincks e Stanley (1986) por sua vez, associaram o endurecimento à ação de múltiplos mecanismos (Figura 1).

Figura 1: Modelo demonstrando a contribuição de algumas enzimas no processo de endurecimento de leguminosas.

A principal teoria que enfatiza o envolvimento de enzimas no processo de endurecimento é a que envolve pectina-cátion-fitato, consolidada por Jones e Boulter (1983). Esta teoria está baseada, principalmente, nos estudos de Mattson (1946) com o endurecimento de ervilhas amarelas. Mattson afirmava que em ervilhas normais o fitato passaria para a lamela média, durante o processo de cocção, quelando os cátions bivalentes e amaciando as sementes (**Figura 1**).

Jones e Boulter (1983) e Shomer e col. (1990) observaram através de microscopia que as células do cotilédone de feijões HTC cozidos apresentavam-se menos separadas do que em feijões normais. A hipótese levantada a partir dessas observações é de que o endurecimento estaria, de fato, relacionado com alterações ocorridas na parede celular e lamela média do cotilédone, levando à sua insolubilização. Grande importância tem sido dada ao estudo destas estruturas e sua relação com o endurecimento, devido ao seu papel na manutenção da integridade dos tecidos vegetais. Além disso, a dissolução da lamela média tem sido relacionada com o abrandamento dos tecidos durante o processo de cocção.

Segundo Jones e Boulter (1983), a ativação da fitase seria a principal responsável pela formação do pectato de cálcio insolúvel. Assim, ao degradar os fitatos presentes nos corpos protéicos, os íons bivalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) seriam liberados, passando facilmente através das membranas celulares danificadas (VARRIANO-MARSTON e JACKSON, 1981), alcançando a lamela média e ligando-se às pectinas, formando pectato insolúvel (SHOMER e col., 1990; MOSCOSO e col., 1984; HENTGES e col., 1991; GARCIA-VELA e STANLEY, 1991; KILMER e col., 1994). Concomitantemente, a liberação do cálcio ativaria a pectinometilesterase, causando a desesterificação das pectinas e aumentando o número de carboxilas livres, contribuindo para a formação de mais pectato de cálcio (LIU, 1995).

Confirmando esta teoria, Moscoso e col. (1984) verificaram que em feijões macios a perda de material péctico para a água de cozimento era maior em feijões endurecidos e assim como Jones e Boulter (1983), observaram que o conteúdo de fitatos em feijões duros era menor do que o

encontrado em feijões novos, sugerindo que poderia estar havendo degradação dos mesmos. Hentges e col. (1991), verificaram, também, uma correlação negativa entre o conteúdo de fitato e o tempo de armazenamento e observaram que à medida que o feijão endurecia, o conteúdo de pectinas altamente metoxiladas, a solubilidade da amilose e da proteína diminuía e a atividade da fitase aumentava.

Kilmer e col. (1994) verificaram que havia liberação de íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e fosfato quando os feijões eram macerados na água à 25°C por 16 horas e que em feijões envelhecidos a quantidade de íons liberados era maior do que em feijões novos. Além disso, observaram que sementes tratadas com fluoreto de sódio não desenvolviam o fenômeno HTC. Concluíram então, que o íon fluoreto impede o endurecimento através de inibição competitiva com o fitato, pela formação de fluoretos de Ca^{2+} e Mg^{2+} insolúveis.

Aguilera e Rivera (1985) adicionaram agentes quelantes, à água de maceração e verificaram que em soluções neutras o EDTA amaciava os feijões mais eficientemente que o Na_2HPO_4 , e NaHCO_3 . Por sua vez, Liu e col. (1992) verificaram que os íons trivalentes eram menos eficientes para induzir o HTC do que os bivalentes e que a maceração em soluções contendo EDTA revertia completamente o endurecimento enquanto que em EGTA, a reversão era parcial. Del Valle e Stanley (1995) e Paredes-López e col. (1991) verificaram, também, que a maceração de sementes endurecidas em soluções quelantes provocava o amaciamento das sementes.

Bernal-Lugo e col. (1991), entretanto, não verificaram difusão de ácido fítico das sementes para a água de cozimento e deduziram que o ácido fítico não estaria atuando como agente quelante durante o cozimento e amaciamento das sementes. Varriano-Marston e Jackson (1981) também acreditam que a hidrólise dos fitatos pode não ser a causa do endurecimento, mas pode ser um efeito dos processos degradativos que podem estar ocorrendo nas células. Por exemplo, a digestão autofágica dos corpos protéicos.

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. 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 e JACKSON, 1981; JONES e BOULTER, 1983; RICHARDSON e STANLEY, 1991; LIU, 1995). Esta perda de permeabilidade seletiva também seria responsável pela passagem do cálcio para a lamela média, contribuindo com a formação dos pectatos de cálcio.

Além da fitase, outras enzimas como a lipase, lipoxigenase, protease e peroxidase são, também, citadas como responsáveis pelo processo de endurecimento. A ativação das enzimas durante o envelhecimento causariam a hidrólise de lipídios, fitatos e proteína, que em conjunto com a ação de microorganismos e a formação de radicais livres, levaria à produção de ácidos fazendo o pH do meio cair. O pH baixo e a desesterificação das pectinas causariam redução na β -eliminação, que ocorre somente em presença de calor e em meio que varia de neutro à alcalino, nas porções metiladas das pectinas. Numa revisão feita por Liu (1995), o autor cita o trabalho realizado por Albersheim e col., onde mostra que os grupos carboxila da pectina precisam estar metilados para que a β -eliminação ocorra. Neste mesma revisão, Liu (1995) tenta explicar através de outros trabalhos, a relação entre o endurecimento e as teorias pectina-fitato e a importância da β -eliminação.

Além disso, Liu (1995) analisa o resultado de alguns trabalhos envolvendo a gelatinização de amido e coagulação de proteína de reserva e conclui que, em feijões envelhecidos, há diminuição da temperatura de transição térmica (T_m) das proteínas, ao passo que a temperatura de gelatinização do amido continua constante. Com a coagulação prévia da proteína, se formaria uma barreira à passagem de água que impedindo o embebedimento e gelatinização dos grãos de amido.

Aguilera e Rivera (1992), com base em experimentos realizados com feijões endurecidos e soluções contendo EDTA, dividiram o defeito HTC

em duas partes (irreversível e reversível). O objetivo do experimento é remover os cátions bivalentes pela ação de agentes quelantes e substituí-los por cátions monovalentes, revertendo o endurecimento causado pela formação de pectatos de cálcio. Os pesquisadores observaram que o EDTA revertia significativamente o endurecimento de feijões. Assim denominaram esse valor de redução da dureza, em relação ao no nível de dureza total de fração reversível e o nível de dureza restante, que não conseguiu ser revertido pelo tratamento, de fração irreversível.

Esta observação ajuda a explicar a teoria dos múltiplos mecanismos de Hincks e Stanley (1986) e dos múltiplos canais de Liu (1995). Pode-se concluir então, que o nível de reversão, conseguido pelos agentes quelantes, está relacionado com a formação de pectatos de cálcio e que outros fatores contribuem com a parte irreversível do fenômeno. Del Valle e Stanley (1995), apoiaram essa idéia e verificaram que a teoria fitato-fitase poderia realmente ser responsável pela parte reversível do fenômeno e que reações como a de lignificação estariam relacionadas com a parte irreversível. Logicamente, o mais sensato seria atribuir o endurecimento à múltiplas causas e não somente a uma enzima, provocando um fenômeno isolado. As revisões mais recentes têm associado os vários trabalhos existentes e apontado para este caminho (HINCKS e STANLEY, 1986; LIU, 1995).

São muitos os pesquisadores que têm estudado a relação entre os íons bivalentes, o fitato e a atividade da fitase no processo de endurecimento das sementes (AGUILERA e RIVERA, 1992; PAREDEZ-LÓPEZ e col., 1991; DEL VALLE e STANLEY, 1995; KYRIAKIDIS e col., 1997; BERNAL-LUGO e col., 1990; BERNAL-LUGO e col., 1991; HENTGES e col., 1991; JONES e BOULTER, 1983, LIU e col., 1992; LIU, 1995; OCKENDEN e col., 1997; GARCIA e col., 1993). Porém são poucos os trabalhos que relacionam o endurecimento com a formação de ligações cruzadas (diferulato e isoditirosina) entre as pectinas, extensina e compostos fenólicos, causando insolubilização dos constituintes da parede celular. As teorias descritas acima encontram-se relacionadas na **Figura 2**, compondo a teoria dos múltiplos canais, proposta por Liu (1995).

Figura 2: Modelo de mecanismo multicanal, mostrando eventos sequenciais que levam ao HTC em leguminosas, segundo trabalho de Liu, K. (1995).

Como foi comentado, parte da responsabilidade pelo endurecimento é atribuída à menor disponibilidade de água nas células do cotilédone de feijões envelhecidos. 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. Com isto, ocorreria uma restrição de entrada de água nas células, o que resultaria em uma limitação na desnaturação das proteínas e gelatinização do amido (LIU, 1995; GARCIA-VELA e STANLEY, 1989). Muitos trabalhos, contudo, verificaram alterações ocorridas com as proteínas de reserva e com o amido em feijões HTC. Isto pode significar que a falta de gelatinização do amido e desnaturação da proteína é devido a outras causas além da limitação no conteúdo de água nas células, todavia, existem muitas controvérsias.

Muitos pesquisadores estudaram as alterações no comportamento do amido durante o desenvolvimento do HTC (VINDIOLA e col., 1986; HOLBERG e STANLEY, 1987; HINCKS e col., 1987; PAREDES-LÓPEZ e col., 1988; GARCIA-VELA e STANLEY, 1989; GARCIA e LAJOLO, 1994; LIU, 1995). Paredes-López e col. (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 o amido e a 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.

1.2.3.3.- Teorias envolvendo os materiais de reserva como o amido e a proteína no processo de endurecimento.

Hohlberg e Stanley (1987) não verificaram alterações significativas na temperatura de gelatinização em amido isolado de feijões novos e endurecidos. Notaram, porém, aumento na temperatura de

gelatinização em amido obtido de feijões armazenados nas três condições utilizadas no experimento (temperatura e umidade altas, médias e baixas). Sugeriram, então, que as alterações físicas e estruturais no amido, eram provocadas pelo longo tempo de armazenamento, independentemente das condições de armazenamento.

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 (armazenados a 40°C / 75% UR durante 2 meses) e HTC-envelhecido (armazenados à temperatura e umidade locais por 5 anos), 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, apresentavam uma quantidade maior de amido resistente ao ataque enzimático do que as amostras controle, confirmando a menor susceptibilidade do amido de feijões HTC.

Holberg e Stanley (1987) verificaram que o aumento na temperatura de gelatinização do amido, observado em feijões envelhecidos sob condições inadequadas, não estava relacionado com o endurecimento em si, mas sim com os longos tempos de armazenamento. Garcia e Lajolo (1994) também observaram através de calorimetria (DSC), aumento na temperatura de gelatinização do amido isolado de feijões HTC-envelhecido, mas não verificaram este comportamento em feijões HTC-acelerado. Tudo indica que, o aumento na temperatura de gelatinização do amido em feijões endurecidos se devia mais aos períodos prolongados de armazenamento e não ao endurecimento provocado pela temperatura e umidade elevadas.

Garcia-Vela e Stanley (1989), afirmaram que quando o amido era isolado, o conteúdo de água não seria mais um fator limitante. Eles acreditam que a disponibilidade limitada de água nas células do cotilédone, devido à impermeabilização da parede celular, reduziria a

gelatinização do amido e a desnaturação protéica, causando o endurecimento. Vindiola e col., (1986) sugeriram, contudo, que o endurecimento dependia da separação das células no cozimento e não na gelatinização do amido ou da disponibilidade de água.

Estudos dos padrões de eletroforese das proteínas de feijões controle e envelhecidos também mostraram alterações na estrutura das proteínas (HUSSAIN e col., 1989, HUSSAIN e BUSHUK, 1991). Holberg e Stanley (1987), observaram padrões de eletroforese em feijões duros, e verificaram que as proteínas encontravam-se mais hidrolisadas. Contudo, Hussain e col. (1989), observaram o aparecimento de bandas novas de menor mobilidade, sugerindo que houve associação das proteínas.

A revisão de Liu (1995) baseia-se em um trabalho anterior (LIU e col., 1992b) para explicar a relação entre a gelatinização do amido e as mudanças na solubilidade da proteína. Segundo Liu, em amostras de feijão armazenadas a 30°C/64% UR durante 18 meses, a temperatura de transição térmica da proteína diminui de 100 para 56°C, ao passo que a temperatura de gelatinização do amido permanece praticamente constante na faixa de 64 a 73°C. Como resultado, a temperatura de coagulação da proteína de reserva torna-se menor do que a temperatura de gelatinização do amido. Dessa forma a coagulação da proteína prevalece em detrimento da gelatinização do amido. Neste caso, a proteína coagulada forma uma barreira à entrada de água nos grãos de amido, impedindo a gelatinização do mesmo. No caso de feijões novos, a gelatinização do amido prevalece, e a coagulação posterior da proteína não pode mais impedir o embebedimento do amido pela água.

1.3.- Polissacarídeos da parede celular e seu papel no endurecimento.

A parede celular de vegetais é uma estrutura altamente complexa e dinâmica (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Ela é constituída, principalmente, de microfibrilas de celulose embebidas numa matriz de polissacarídeos solúveis, proteína estrutural (extensina, que são

glicoproteínas ricas em hidroxiprolina) e não estrutural (enzimas, principalmente), compostos fenólicos e água.

As microfibrilas de celulose são constituídas por polímeros de glicose, cujos monômeros unem-se por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e são estabilizadas por pontes de hidrogênio, formando uma estrutura cristalina. Espaçadamente distribuídas pelos feixes de celulose, observa-se a presença de zonas amorfas, que podem ligar-se aos polissacarídeos não celulósicos. As hemiceluloses (arabinoxilanos ou xiloglicanos, por exemplo) circundam as microfibrilas de celulose e ligam-se à elas através de pontes de hidrogênio. Esta estrutura altamente complexa encontra-se mergulhada numa matriz de polissacarídeos solúveis em água denominadas amplamente de pectinas.

Na parede celular de dicotiledoneas, da qual fazem parte o feijão, temos abundância em polissacarídeos de origem péctica, como homogalacturonanos, pectatos de cálcio, ramnogalacturonanos e, ligados aos ramnogalacturonanos, principalmente, nas moléculas de ramnose, encontramos cadeias laterais de arabinanos (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Esta estrutura complexa e solúvel estaria envolvida com os mecanismos que levariam à insolubilização e endurecimento dos feijões.

Acredita-se que durante o processo de envelhecimento, ocorre um aumento de ligações cruzadas entre os polissacarídeos e os demais componentes da parede celular, como proteína (extensina) e compostos fenólicos (**Figura 3**). Este aumento de ligações cruzadas causaria a insolubilização dos polissacarídeo e das proteínas, provocando impermeabilização da parede celular. Assim, a parede celular atuaria como uma barreira, dificultando a entrada de água nas células. Esta redução na disponibilidade de água dentro das células levaria a uma limitação da gelatinização do amido e desnaturação da proteína contribuindo com o endurecimento.

Figura 3) As possíveis ligações relacionadas com a insolubilização dos componentes da parede celular.

A ação da pectinometilesterase contribuiria, também, com o endurecimento e insolubilização da parede celular e lamela média, causando aumento na quantidade de carboxilas livres e conseqüente formação de pectatos de cálcio insolúveis. Isto dificultaria a separação das células do cotilédone durante o processo de cocção (GARCIA e col., 1993; VARRIANO-MARSTON e JACKSON, 1981; SHOMER e col., 1990) levando, mais uma vez, ao endurecimento das sementes. Garcia e col. (1993) compararam feijões endurecidos com macios e verificaram uma menor separação entre as células nos feijões endurecidos. Os mesmos autores verificaram, também, que havia maior quantidade de grupos carboxila livres e de cálcio na lamela média de feijões HTC, facilitando a formação dos pectatos de cálcio. Esta teoria parece ser bastante consistente, considerando-se que a parede celular de vegetais é muito importante para a manutenção da textura de frutas e vegetais (STOLLE-SMITHS e col., 1995).

Gooneratne e col. (1994), constataram que os tecidos tornavam-se macios durante a cocção, principalmente, devido ao rompimento dos

constituintes da parede celular e degradação e solubilização dos polissacarídeos pécticos. Tudo indica que a insolubilização desses polissacarídeos, provocada pelo aumento de ligações cruzadas, causaria o endurecimento da semente através da redução na solubilização e degradação dos polissacarídeos. Dessa maneira haveria uma menor separação das células, provocando restrição da entrada de água o que dificultaria a gelatinização do amido e a desnaturação das proteínas. Além disso, Jones e Boulter (1983) observaram em trabalhos realizados por microscopia eletrônica, que a lamela média encontrava-se dissolvida em feijões novos, ao contrário do observado em feijões envelhecidos.

Muitas pesquisas têm sido feitas para elucidar este fenômeno, inclusive abordagens amplas como as de Hincks e Stanley (1986) que propuseram múltiplos mecanismos para explicar a causa do endurecimento em feijões. Recentemente, foram publicadas várias revisões (STANLEY e AGUILERA, 1985; REYES-MORENO e PAREDEZ-LÓPEZ, 1993; LIU, 1995) abordando os inúmeros mecanismos sugeridos. Todavia, apesar dos estudos realizados, até o presente momento, o mecanismo exato ainda não foi estabelecido.

O conhecimento, entretanto, das alterações da solubilidade e da estrutura química dos polissacarídeos da parede celular da casca e do cotilédone de feijões, provocadas durante o armazenamento, poderá auxiliar no entendimento das causas de seu endurecimento. Esses estudos servirão de ferramentas para encontrar formas de armazenamento que não induzam a formação de feijões com características *hard-to-cook* e, portanto, que preservem as características nutricionais e organolépticas dessas sementes.

2.- OBJETIVO

O presente trabalho visa isolar e caracterizar os polissacarídeos da parede celular de feijões macios e endurecidos pelo armazenamento e verificar as possíveis alterações na sua solubilidade e composição química.

3.- MATERIAIS

3.1.- Sementes Utilizadas

Semente:	Feijão, <i>Phaseolus vulgaris</i> L., adquirido no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).
Origem:	Itapetininga, S.P. - Região de Paranapanema
Cultivar:	IAC - Carioca
Colheita:	10/07/93
Germinação:	93% em 07/93
Germinação mínima:	70% (válida até 01/94)
Pureza:	99,9%

3.2.- Reagentes Utilizados

Enzimas de extração: α -amilase termoestável (A-3306), protease (P-3910), amiloglicosidase de *Aspergillus niger* (A-9913) da Sigma Chemical Company.

Reagentes do fracionamento: ácido 1,2-diaminociclohexano N, N, N', N' tetracético (CDTA), 98% d Sigma; NaOH (P.A.) da Merck; boroidreto de sódio (NaBH_4) da Sigma Chemical Company.

Reagentes e padrões para cromatografia: D(+)fucose (F-2127) da Sigma e L-ramnose (17,198-0), L-arabinose (A9,190-6), D-xilose (X107-5), α -D-glicose (25,307-3), D-galactose (11,2589-3), D-manose (11,258-5) e inositol (I-665-2) da Aldrich Chemical Company. Diclorometano (CH_2Cl_2), 6% de pureza, cat. 15,479-2 99 e acetato de etila ($\text{CH}_3\text{-CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$), 99,5% de pureza, cat. 15,485-7, ambas graus espectrofotométrico da Aldrich.

Materiais especiais: filtros de fibra de vidro GF/F (Whatmann); tubos de diálise Spectra/por® da Spectrum, MWCO: 12.000-14.000; coluna capilar de sílica fundida de 30 metros de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,20 μm de espessura de filme (SP-2330, Supelco); *kit* BCA-

Protein Assay Reagent do fabricante Pearce; tubos de centrífuga (Corex[®]).

Equipamentos e demais reagentes: Meyer N-evap-analytical evaporator da Organomation; cromatógrafo a gás CG 500 da CG; todos os demais reagentes utilizados eram grau P.A., do fabricante Merck ou Nuclear.

4.-MÉTODOS

4.1.- Armazenamento das Sementes

Após a colheita e recebimento, as sementes foram separadas em três lotes, nas seguintes condições:

Lote 1: Armazenadas em câmara fria à temperatura de 4°C em sacos de folha dupla de papel craft e em sacos com folha dupla de polietileno.

Lote 2: Armazenados à temperatura e umidade relativa (U.R.) ambiente (TA) da região de São Paulo, S.P. no período de 10/08/93 a 31/07/95 em sacos de folha dupla de papel craft. Os feijões ficaram expostos, respectivamente, a temperatura e umidade média de 17°C/80% U.R. no período de 2 meses, 20°C/78%UR no período de 8 meses e 19°C/78%UR no período de 24 meses, de acordo com os dados fornecidos pela estação meteorológica do Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo.

Lote 3: Armazenados em estufa a 37°C / 75% UR em dessecadores fechados sob vácuo, contendo solução de NaCl saturada. Para garantir a presença de oxigênio e homogeneidade das condições de armazenamento, os dessecadores foram abertos e as sementes revolvidas uma vez por semana.

Grupo controle: sementes do lote 2 armazenadas durante 2 meses.

4.1.1.-Tempo de armazenamento

Os feijões foram armazenados entre 2 a 24 meses conforme quadro descrito abaixo:

Lotes	Armazenamento	
	Condições	Tempo (meses)
1	4°C	3½, 6½, 11 e 24
2	TA ^a	2 ^b , 8 e 24
3	37°C / 75 % UR ^c	2½, 3½ e 6½

Quadro 1: Tempo e temperatura de armazenamento das sementes. Sendo a=temperatura e umidade ambiente; b=grupo controle; c=umidade relativa.

4.2.- 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 então, 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).

4.3.- Germinação das sementes

Os feijões foram testados quanto à sua capacidade de germinação. As sementes foram colocadas em placas de Petri contendo algodão embebido em água e deixadas sob condições ambientes. O teste foi realizado em quadruplicata, cada placa contendo 25 feijões. Foram consideradas como positivas as sementes que após um período máximo de duas semanas apresentavam talos, folhas e raízes desenvolvidas e negativas as sementes que deterioraram ou não apresentavam desenvolvimento normal de talos folhas e raízes. Os valores obtidos foram expressos pela média da porcentagem de sementes germinadas por placa.

4.4.- Tempo de cocção

As sementes foram maceradas durante 16h em água deionizada na proporção de 1:4 (p:v / semente:água). 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. Foi calculada a média entre as quatro determinações.

4.5.- Isolamento da parede celular

O isolamento da parede celular solúvel (PCS) e insolúvel (PCI) do cotilédone e do tegumento foi realizado utilizando-se método enzimático-químico de extração adaptado dos trabalhos de Prosky (1988), McLaughing e Gay (1990) e Carpita (1983). O tratamento enzimático descrito a seguir foi baseado nos trabalhos de Prosky (1988) e McLaughlin (1990). O tratamento químico foi adaptado do trabalho realizado por Carpita (1983).

Na extração enzimático-química, as paredes celulares foram obtidas mediante hidrólise enzimática do amido e da proteína, utilizando α -amilase termoestável, protease e amiloglicosidase. Após o tratamento enzimático segue-se tratamento químico utilizando tampão fosfato para extrair as proteínas que não foram hidrolisadas pela enzima, dimetilssulfóxido para remoção de possíveis resíduos de amido não hidrolisado e clorofórmio / metanol para extrair resíduos de lípidos e pigmentos.

4.5.1.- Preparo das amostras

Os feijões foram descascados manualmente e a casca, o cotilédone e o embrião foram separados. O tegumento e o cotilédone foram triturados em moinho de facas. As farinhas obtidas foram passadas por tamis com abertura de 0,5 mm e utilizadas para o isolamento das paredes celulares utilizando o método de extração enzimático-químico adaptado.

4.5.2.- Tratamento enzimático do cotilédone e do tegumento.

Meio grama (0,5g) de farinha de cotilédone ou tegumento foram incubadas com 0,1 mL de α -amilase em 25 mL de tampão fosfato 0,08M / pH 6,0 durante 30 min sob banho de água em ebulição. As amostras foram agitadas manualmente a cada 5 min e resfriadas no final do tratamento. A seguir, as amostras foram tratadas com 0,1 mL de protease (0,5mg / 0,1mL) a 60°C em pH 7,5 e com 0,3 mL de amiloglicosidase em pH 4,3 sob agitação constante (100 r.p.m.) por período de 1h à cada enzima adicionada.

As suspensões contendo o hidrolisado foram centrifugadas a 7710g por 10 min e os resíduos obtidos foram lavados com (3x) 10 mL de água destilada. Os sobrenadantes e as águas de lavagem obtidos do tegumento foram filtrados em filtros de fibra de vidro e levados à concentração de 80% em etanol resfriado em gelo para precipitar as pectinas. Os sobrenadantes e as águas de lavagem do cotilédone não foram filtrados, mas foram igualmente levados à 80% em etanol resfriado. As misturas etanólicas foram centrifugadas a 7710g por 15 min e os precipitados obtidos foram lavados com (3x) 10mL de etanol 80% resfriado, ressuspensos em água destilada, liofilizados e pesados, correspondendo à porção solúvel em água da parede celular do tegumento (PCS-Te) e cotilédone (PCS-Co).

Os resíduos do tegumento e cotilédone resultantes do tratamento enzimático foram submetidos à tratamentos químicos distintos conforme descrito abaixo (**Figuras 4**).

4.5.3.- Tratamento químico do cotilédone

Os resíduos obtidos da hidrólise enzimática foram tratados com (2x) 10 mL de tampão fosfato 0,5 M / pH 7,2 para retirar resíduos de proteína e lavados com (2x) 10 mL de água destilada. Para eliminar os lípides e pigmentos presentes, os resíduos foram tratados com (2x) 10 mL de clorofórmio:metanol (1:1 / v:v) a 45°C por 30 min e com (2x) 10 mL de metanol, sendo finalmente lavados com (2x) 10 mL de água destilada. O amido não hidrolisado pelas enzimas foi extraído tratando as amostras com

(2x) 10 mL de DMSO a 90% durante 20 min sob efeito de ultra-som e (2x) com 10mL de DMSO a 90%, sendo lavados (5x) em seguida com água destilada. Os sobrenadantes obtidos da extração com DMSO foram dialisados durante 48h em água destilada, liofilizados e pesados, correspondendo à fração denominada amido residual (AMR)

Os resíduos finais foram ressuspensos em água, liofilizados e pesados, correspondendo à porção insolúvel da parede celular do cotilédone (PCI-Co). Entre as etapas de extração e lavagem, as suspensões foram centrifugadas a 7710g por 15 min para separar as fases (**Figura 4**).

4.5.4.- Tratamento químico do tegumento

Os resíduos obtidos da hidrólise enzimática da farinha do tegumento foram tratados com (2x) 10 mL de clorofórmio:metanol (1:1 / v:v) a 45°C / 30 min, (2x) 10 mL de metanol e lavados com (3x) 10 mL de água destilada. As suspensões foram centrifugadas a 7710g por 20 min para separar as fases em cada etapa da extração. Os resíduos obtidos foram ressuspensos em água destilada, liofilizados e pesados correspondendo à porção insolúvel da parede celular do tegumento (PCI-Te) (**Figura 4**).

4.6.- Caracterização química da parede celular

As PCI-Co, PCI-Te, PCS-Co, PCS-Te e AMR foram caracterizadas quanto ao seu conteúdo de açúcares neutros, ácidos urônicos e de proteína. Nos produtos de fracionamento da PCI-Co também foram determinados o conteúdo de açúcares neutros e ácidos. Os açúcares neutros foram determinados por cromatografia a gás, os ácidos urônicos pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) e a proteína utilizando ácido bicinconínico (BCA) (SMITH e col., 1985; WIECHELMAN, e col., 1988). Para a determinação de ácidos urônicos e proteína, as amostras liofilizadas de cada parede celular foram suspensas ou dissolvidas em água destilada (0,5 mg de parede/ mL de água) e quando necessário foram trituradas na presença de água em homogeneizador de tecidos com pistilo de Teflon®.

Figura 4: Fluxograma da extração de parede celular insolúvel (PCI), solúvel (PCS) e amido residual (AMR) do cotilédone e do tegumento de feijões pelo método enzimático-químico.

4.6.1.- Determinação de proteínas:

A determinação de proteína foi realizada através de colorimetria (SMITH e col., 1985; WIECHELMAN, e col., 1988) utilizando o *kit* BCA[®] (PEARCE), cujo método está baseado na reação de Biureto.

Princípio: o BCA (*Bicinchoninic acid*), na forma de seu sal de sódio hidrossolúvel, é um reagente sensível, estável e altamente específico para o íon Cu^{1+} . A estrutura macromolecular e quatro aminoácidos (cisteína, cistina, triptofano e tirosina) foram reportados como sendo responsáveis pela formação de cor nas amostras de proteína quando testadas com o BCA. O esquema da reação (**Figura 5**) mostra como o BCA se combina com o Cu^{1+} (proveniente da redução do Cu^{2+} a Cu^{1+} pela proteína em meio alcalino) semelhante à conhecida reação do biureto. A reação púrpura produzida, é formada pela interação de duas moléculas de BCA com um íon Cu^{1+} . O produto dessa reação é hidrossolúvel e exibe uma forte absorbância a 562nm. Isto permite a quantificação espectrofotométrica da proteína em solução aquosa. Como curva padrão, utilizou-se soluções contendo 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ de albumina de soro bovino.

Complexo BCA- Cu^{1+}

Figura 5: Reação do ácido bicinconínico

4.6.2.- Determinação de ácidos urônicos

Em 400 μ L (2 $\times$) de cada amostra (0,5mg/mL), adicionou-se 40 μ L de solução de sulfamato de potássio-ácido sulfâmico 4M (pH 1,6) em tubos de ensaio mantidos sob banho de gelo. A mistura foi agitada vigorosamente, adicionando-se em seguida 2,4 mL de tetraborato de sódio 0,075M em ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram agitados e resfriados novamente, sendo então retirados do gelo e incubados por 20 min em banho de água em ebulição. Em seguida, os tubos foram resfriados no banho de gelo, e a eles adicionou-se 40 μ L de solução de m-hidroxidifenil a 0,15% (p:v) em NaOH 0,5% (p:v). Após 5 min, houve o desenvolvimento de coloração rosada (estável por 1h) cuja absorbância pode ser lida em espectrofotômetro a 525 nm (**Figura 6**). A concentração de ácidos urônicos da amostra foi determinada contra branco e curva padrão contendo 50, 100, 150 e 200 nmoles de ácido galacturônico. Os resultados obtidos foram expressos em μ gác.urônicos/mgparede e porcentagem de ácidos urônicos.

Figura 6: Determinação de ácidos urônicos.

4.6.3.- Determinação de açúcares neutros

Os açúcares neutros (ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glicose), excluindo a glicose derivada da celulose, foram determinados por cromatografia a gás após a hidrólise ácida dos polissacarídeos e transformação dos monômeros em acetato de alditol.

4.6.3.1.- Hidrólise dos polissacarídeos

Um miligrama (2x) de produto liofilizado foi pesado em frascos herméticos com tampas revestidas de Teflon® e a ele adicionado 1 mL de ácido trifluoro acético (TFA) 2N, contendo 1 μ mol de mioinositol (padrão interno).

A amostra foi hidrolisada por 90 min em bloco digestor a 120°C, e submetida a agitação a cada 30 min. No final da incubação a amostra foi resfriada e centrifugada a 755g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um frasco novo e a este adicionou-se 1 mL de tert-butil álcool (TBA). A mistura obtida foi então evaporada sob fluxo de N₂ com aquecimento em banho de água a 45°C. Paralelamente à cada grupo de análise, (2x) 1 mL da mistura de padrões (3 μ moles de cada padrão/mL de TFA 2N contendo padrão interno) foi submetida à hidrólise (ALBERSHEIM, 1967).

4.6.3.2.- Preparo de derivados de acetato de alditol

Os açúcares neutros livres foram convertidos a acetato de alditol (BLAKENEY e col., 1983) com modificações propostas por Carpita e Whittern, (1986).

Ao açúcar liberado, adicionou-se 0,5 mL de dimetilssulfóxido (DMSO) contendo 20 mg / mL de boroidreto de sódio (NaBH₄) e 100 μ L de NH₄OH 1M. A mistura foi incubada a 40-45°C em banho de água por 90 min, com agitação a cada 30 min. Ao final da incubação, a mistura foi neutralizada com 100 μ L de ácido acético glacial (HAc). Em seguida, adicionou-se à mistura 100 μ L de 1-metilimidazol (catalisador) e 0,5 mL de anidrido acético. Posteriormente, esta mistura foi incubada durante 30 min em banho de água

a 40-45°C. Ao produto final, adicionou-se 1,5 mL de água aos frascos para diluir a mistura e diminuir a sua densidade. O acetato de alditol assim obtido foi extraído da mistura aquosa com duas alíquotas de 0,5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) sob agitação vigorosa. Os extratos CH_2Cl_2 contendo o acetato de alditol foram separados da mistura aquosa por centrifugação a 755g por 5 min, recolhidos com pipeta Pasteur e lavados com (2x) 1 mL de água destilada mediante agitação vigorosa por 1-2 min. A separação dos extratos CH_2Cl_2 após cada lavagem foi realizada por centrifugação como foi mencionado anteriormente. Os extratos CH_2Cl_2 lavados foram transferidos para frascos secos e evaporados sob fluxo de N_2 à 40-45°C.

O acetato de alditol obtido, foi dissolvido em acetato de etila ($\text{CH}_3\text{-COO}_2\text{H}_5$) grau cromatográfico e injetado no cromatógrafo a gás. A reação de redução e acetilação encontra-se esquematizada na **Figura 7**.

Figura 7: Redução e acetilação de açúcares

4.6.3.3.- Cromatografia a gás dos açúcares neutros.

Os derivados foram separados e identificados em coluna capilar de sílica fundida, utilizando cromatógrafo a gás com detetor de ionização de chama sob gradiente de temperatura (170-240°C) e foi utilizado mioinositol como padrão interno. Foram injetadas alíquotas que variaram de 1 a 3 μL da

amostra dissolvida em acetato de etila. Como gás de arraste foi utilizado N₂ grau cromatográfico e para combustível da chama hidrogênio U (ultra-puro) com fluxo de 30 mL/ min. A temperatura do injetor e detetor foi mantida à 250°C.

Os açúcares obtidos foram expressos em $\mu\text{g}_{\text{açúcares}} / \text{mg}_{\text{parede}}$ e em porcentagem de açúcares. Para a obtenção dos resultados foram realizados os seguintes cálculos:

Eq.(1)

$$\text{RF} = \frac{\text{área do padrão interno}}{\text{área do açúcar padrão}} \times 3$$

Eq.(2)

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

Eq.(3)

$$\text{PM}_A = \text{PM}_{\text{açúcar}} - \text{PM}_{\text{água de ligação}}$$

Eq.(4)

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

Onde: PM = peso molecular

m = massa em mg

As etapas envolvidas na realização da hidrólise, acetilação e cromatografia encontra-se apresentada na **Figura 8**.

Figura 8: Hidrólise e acetilação de açúcares neutros. TFA = ácido trifluoroacético, TBA = terc-butil álcool, DMSO = dimetilssulfóxido

4.6.4.- Fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone

A PCI-Co foi fracionada segundo a metodologia descrita por Carpita (1983). As paredes celulares obtidas foram fracionadas, inicialmente com solução quelante (CDTA) com finalidade de extrair a pectina ligada através de pontes de Ca^{2+} . A pectina imobilizada por ligações éster, lábeis em meio básico (ligações cruzadas com ácido ferúlico), foram extraídas em meio alcalino de baixa molaridade.

As hemiceluloses foram extraídas em gradiente de hidróxido de sódio em presença de borohidreto em atmosfera de nitrogênio. As celulosas foram isoladas através da digestão ácida do resíduo final, resultante da extração alcalina. Foram determinados os teores ácidos urônicos e açúcares neutros dos polissacarídeos obtidos em cada etapa do fracionamento.

Trinta miligramas (2×) de PCI-Co liofilizada de feijões armazenados em diferentes condições, foram extraídos com 10 mL de CDTA 0,05M / pH 6,5 por 16h à temperatura de 22°C sob agitação na presença de gotas de tolueno em tubos de centrifuga (COREX®). A mistura foi centrifugada a 1475g/10 min e o sobrenadante foi filtrado em filtros de fibra de vidro sob vácuo. O filtrado foi dialisado em água destilada a 22°C por 72 h, liofilizado e pesado, correspondendo à fração CDTA. O resíduo foi lavado com 10 mL de água destilada. A suspensão foi centrifugada e a água de lavagem (sobrenadante) foi dialisada, liofilizada e pesada como descrito acima. O resíduo foi extraído consecutivamente com 10 mL de NaOH 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; e 1,0 N por 1h, na presença de 3 mg/mL de NaBH_4 à 22°C sob atmosfera de N_2 e agitação constante e com NaOH 4,0 N por 16h nas mesmas condições (Figura 9).

Os sobrenadantes referentes a cada concentração de hidróxido, obtidos após a centrifugação a 1475g/10min, foram neutralizados com ácido acético glacial e dialisados separadamente em água destilada por 48h, sendo em seguida liofilizados e pesados correspondendo às frações 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; e 4,0N. O resíduo final foi lavado (5×) com 10 mL de água destilada. Após a lavagem, o resíduo foi ressuspensionado em água destilada liofilizado e pesado.

Figura 9: Fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co).

O resíduo final liofilizado foi tratado com uma mistura de água:ácido acético glacial:ácido nítrico (2:8:1 / v:v:v), numa proporção de 30 mg de amostra para 10mL de reagente acético-nítrico (UPDEGRAFF, 1969), incubado durante 90 min em banho de água sob ebulição. O resíduo final, obtido após a centrifugação, lavagem, liofilização e pesagem correspondeu ao conteúdo de celulose (CEL) da PCI-Co. Pela diferença de peso, encontrou-se a quantidade de hemiceluloses não extraíveis (HNE).

Posteriormente, realizou-se a determinação de ácidos urônicos e açúcares neutros de cada fração obtida do fracionamento PCI-Co em todas as condições de armazenamentos, segundo metodologia descrita nos itens 4.6.2. e 4.6.3.

4.7.- Esquema do método de extração, fracionamento e caracterização.

Na figura baixo, apresentamos de forma sucinta o fluxograma de extração, fracionamento e caracterização da parede celular de feijões controle e submetidos às três condições de armazenamento (4°C, TA e 37°C/75% U.R.) entre período de 2 a 24 meses.

Figura 10: Fluxograma de extração, fracionamento e caracterização da parede celular de feijões controle e armazenados a 4°C, TA e 37°C.

5.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.- Umidade, germinação e tempo de cocção das sementes

Verificamos pela **Tabela 1**, que feijões armazenados a 4°C por 24 meses, tiveram aumento de umidade de 8,8% em relação aos feijões controle (9,9%). No período de 6½ meses o teor de umidade teve seu pico máximo em 12,4 %. Nenhuma alteração nos valores de germinação e no tempo de cocção (**Tabela 1**) foi constatada nas sementes armazenadas entre 3½ e 24 meses, quando comparadas com o grupo controle (86,7% e 34,5 min).

Tabela 1: Umidade, germinação e tempo de cocção de feijões controle e armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C

Tempo de armazenamento (meses)	Umidade %	Germinação	Tempo de cocção (min)
Armazenamento a 4 °C			
controle	9,909 ± 0,09	86,7 ± 7	34,5 ±2
3½	11,573 ± 0,12	94,0 ± 15	31,6 ±2
6½	12,434 ± 0,05	91,0 ± 3	33,0 ±2
11	-	84,7 ± 8	31,8 ±2
24	10,781 ± 0,08	91,0 ± 4	31,5 ±2
Armazenamento a TA			
controle	9,909 ± 0,09	86,7 ± 7	34,5 ±2
8	11,357 ± 0,07	71,0 ± 7	42
24	13,752 ± 3,49	72,0 ± 5	79,5 ±7
Armazenamento a 37°C			
controle	9,909 ± 0,09	86,7 ± 7	34,5 ±2
2½	13,856 ± 0,02	69,3 ± 2	74,9 ±10
3½	-	0	271,7 ±4
6½	13,889 ± 0,07	0	>272

TA = temperatura ambiente

Nos feijões armazenados a TA por 24 meses (**Tabela 1**) verificamos um aumento de 39% no teor de umidade, quando comparado com o grupo controle. Os resultados de germinação das sementes (**Tabela 1**) diminuíram após 8 e 24 meses de armazenamento, sendo que, aos 24 meses, mostraram uma redução de 17% em relação ao controle. O tempo de cocção apresentou aumento de 130% (**Tabela 1**) em relação ao controle após 24 meses.

Feijões armazenados a 37°C tiveram aumento de 40% no teor de umidade após 2½ meses (**Tabela 1**), permanecendo constante até 6½ meses, quando comparados com o grupo controle. Após 3½ meses, a germinação da semente era nula (**Tabela 1**) e o tempo de cocção tornou-se 8 vezes maior em relação ao grupo controle (**Tabela 1**), superando este tempo após 6½ meses.

5.2.- Caracterização química do feijão controle

Pela **Tabela 2**, verificamos que o cotilédono de feijão controle possui 9,0% de PCS-Co, 12,3% de PCI-Co e 1,8% de AMR. A PCS-Co (**Tabela 2.1**) é constituída de 38,4% de açúcares neutros, 11,7% de ácidos urônicos e 21,4% de proteína. A PCS-Co em relação aos seus açúcares (**Tabela 2**), é composta por teores altos de arabinose (38,6%) e ácidos urônicos (23,4%), teores médios de xilose (11,2%) e galactose (12,7%) e teores baixos de manose (6,4%) e glicose (6,1%).

Pela **Tabela 2.1**, verificamos que a PCI-Co é constituída de 63,9% de açúcares neutros, 9,1% de ácidos urônicos, 5,6% de celulose, 7,2% de hemiceluloses não extraíveis e 14,5% de proteína. Segundo dados apresentados na **Tabela 2**, excluindo-se a glicose proveniente da celulose, os feijões controle apresentam PCI-Co composto por teores altos de arabinose (34,2%), e glicose (40,5%), teores médios de ácidos urônicos (12,5%) e teores baixos de xilose (6,9%) e galactose (4,6%).

Tabela 2: Conteúdo (%) de parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) do cotilédone e de produtos de fracionamento da PCI-Co em feijões controle com seus respectivos teores de açúcar.

Fração	%	Açúcares Neutros (%)							A.N.	A.U.	Total
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli			
PCS-Co	9,0	1,5	0	38,6	11,2	6,4	12,7	6,1	76,6	23,4	100
PCI-Co	12,3	1,3	0,0	34,2	6,9	0,0	4,6	40,5	87,5	12,5	100
Fracionamento da PCI-Co											
CDTA	8,7	0	0	52,0	9,6	0,0	6,1	6,5	74,2	25,8	100
0,01N	10,6	1,5	0	45,9	10,2	4,8	3,9	3,8	70,2	29,8	100
0,05N	2,5										
0,1N	1,9										
0,5N	16,8	0	0	1,5	0	0	2,7	92,1	96,3	3,7	100
1N	17,2	0	0	2,4	0	0	4,1	90,7	97,2	2,8	100
4N	29,4	1,7	0	55,0	10,3	0	3,4	10,7	81,1	18,9	100
CEL	5,6										
HNE	7,2										
Total	100										
AMR	1,8	0	0	22,7	3,9	11,8	11,7	46,2	96,3	3,7	100

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man= manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, HNE=hemiceluloses não extraíveis, CEL=celulose. Dados extraídos da **Tabela 7** (em anexo).

A fração extraída com DMSO (**Tabela 2**), à qual denominamos amido residual (AMR), não era composta somente de amido resistente ao ataque enzimático. Segundo a **Tabela 2.1**, esta fração é composta por 44,4% de açúcares neutros, 1,7% de ácidos urônicos, 24,4% de proteína. Em relação ao conteúdo de açúcares (**Tabela 2**), é composta por glicose (46,2%), arabinose (22,7%), manose (11,8%), galactose (11,7%), xilose (3,9%) e ácidos urônicos (3,7%).

Tabela 2.1: Conteúdo de açúcares neutros, ácidos urônicos, celulose, hemicelulose não extraíveis e proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co), solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) do cotilédono de feijões controle.

Fração	PCT					Total
	A.N.	AU	CEL	HNE	Proteína	
	%					
PCS-Co	38,4	11,7	-	-	21,4	71,5
PCI-Co	63,9	9,1	5,6	7,2	14,5	100,4
AMR	44,4	1,7	-	-	24,4	70,5

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man= manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, HNE=hemiceluloses não extraíveis, CEL=celulose, PCT=parede celular total.

Após o fracionamento (Tabela 2), os polissacarídeos da PCI-Co apresentaram-se distribuídos da seguinte forma: teores altos de polissacarídeos solubilizados com NaOH 4 N (29,4%), composto principalmente de arabinose (55%), ácidos urônicos (18,9%), glicose (10,7%), xilose (10,3%). Teores médios de polissacarídeos solubilizados com NaOH 0,5 e 1N (16,8% e 17,2%, respectivamente), composto principalmente de glicose (92,1 e 90,7%). Teores baixos de polissacarídeos solubilizados por CDTA e NaOH 0,01N (8,7 e 10,6% respectivamente), composto por arabinose (52,0 e 45,9%), ácidos urônicos (25,8 e 29,8%), xilose (9,6 e 10,2%). Foram encontrados, também, teores muito baixos de polissacarídeos solubilizados com NaOH 0,05N (2,5%) e 0,1N (1,9%) (Tabela 2). No resíduo final da extração alcalina, observamos a presença de 5,6% de celulose (CEL) e 7,2% de material extraído com reagente acético-nítrico (HNE) (Tabela 2). Segundo Updegraff (1969), a lignina e a hemicelulose residual, podem ser extraídas

com ácido acético e nítrico e a celulose remanescente dessa extração pode ser dissolvida com ácido sulfúrico e determinada com reagente de antrona.

Ao observar a composição de açúcares das frações 0,5N e 1 N da PCI-Co (**Tabela 2**), não detectamos xilose, encontramos porém, altos teores de glicose que acreditamos serem provenientes de xiloglicanos, comumente encontrado em leguminosas. Ryden e Selvendran (1990) encontraram nas concentrações de hidróxido acima mencionadas, xiloglicanos pouco ramificadas em vagens de *Phaseolus coccineus*. Isto explicaria, em parte, o fato de não termos detectado xilose em nossas amostras, e obtermos grande quantidade de glicose (**Tabela 2**). Por outro lado, observamos grande quantidade de xilose (em torno de 10%) nas frações ricas em arabinose e ácidos urônicos, como as solubilizadas com CDTA, NaOH 0,01N e 4 N (**Tabela 2**). Gooneratne e col. (1994) verificaram nestas frações a presença de arabinoramnogalacturonanos altamente ramificados, contendo quantidades consideráveis de resíduos xilopiranosil, em trabalho realizado com *Vigna radiata*. Muito provavelmente, esta é a explicação mais plausível para o fato de termos obtido quantidades consideráveis de xilose em frações contendo grande quantidade de arabinose, portanto, ricas em pectina, em detrimento das frações contendo grande quantidade de glicose, portanto, ricas em hemicelulose.

Os principais açúcares presentes nos polissacarídeos da parede celular do cotilédone, apresentam-se esquematizados na **Figura 11**:

Figura 11: Esquema mostrando os componentes da parede celular do cotilédone de feijão controle. PCT=PCI+PCS, AMR = amido residual

Pela **Tabela 3**, observamos que o tegumento de feijões controle é constituído de 72,4 % de PCI-Te e 5,5% de PCS-Te. Segundo a **Tabela 3.1**, a PCS-Te é composta por 16,4% de açúcares neutros, 14,4% de ácidos urônicos, e 18,4% de proteína. Em relação ao conteúdo de açúcares, a PCS-Te é composta por teores altos de ácidos urônicos (46,7%) e arabinose (16,4%), teores médios de galactose (12,0%) e manose (11,3%), teores baixos de xilose e glicose (6,8%) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Porcentagem de polissacarídeos da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento em feijões controle, com seus respectivos teores de açúcar.

Fração	%	Açúcares Neutros (%)							A.N.	A.U.	Total
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli			
PCS-Te	5,5	0	0	16,4	6,8	11,3	12,0	6,8	53,3	46,7	100
PCI-Te	72,4	2,0	0	18,7	32,7	0	3,6	5,0	62,0	38,0	100

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man= manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos. Dados obtidos da **Tabela 8** (em anexo).

Segundo a **Tabela 3.1**, a PCI-Te possui 27,2% de açúcares neutros, 16,7% de ácidos urônicos e 25,3% de proteína. Em relação ao conteúdo de açúcares (**Tabela 3**), desconsiderando a celulose, a PCI-Te é constituída por teores altos de ácidos urônicos (38,0%) e xilose (32,4%), teores médios de arabinose (18,7%) e teores baixos de glicose (5,0%), galactose (3,6%) e ramnose (2,0%).

Na PCI-Te e PCS-Te (**Tabela 3**) a presença elevada de ácidos urônicos (38% e 46,7% respectivamente), deve-se em parte à presença de compostos fenólicos no tegumento. Estes compostos poderiam causar interferência no método adotado por ser colorimétrico.

Tabela 3.1: Conteúdo de açúcares neutros, ácidos urônicos e proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões controle.

Fração	PCT				Total
	A.N.	A.U.	A.T.	Proteína	
	%				
PCS-Te	16,4	14,4	30,8	18,4	49,2
PCI-Te	27,2	16,7	43,9	25,3	69,2

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, A.T.=açúcares totais, PCT=parede celular total.

5.3.- Análise dos rendimentos da parede celular insolúvel (PCI), solúvel (PCS) e amido residual (AMR) do cotilédono e tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Os rendimentos de PCI-Co e PCS-Co, dependem da metodologia de extração utilizada (por exemplo, obtenção da PCS-Co por precipitação com etanol ou diálise) e das características do material (por exemplo, a capacidade de trituração do cotilédono, intimamente relacionada com o armazenamento e teor de umidade das amostras), provocando muitas variações nos resultados, principalmente, em relação à PCS-Co.

O processo de precipitação da PCS-Co com etanol é um passo muito problemático da extração de parede e, nesta etapa, podemos ter perda ou acréscimo de material indesejável.

As diferenças de rendimento observadas entre os três tipos de armazenamento (**Figura 12**) podem estar associadas às alterações ocorridas na estrutura química dos polissacarídeos devido ao longo período de armazenamento, tornando o seu peso molecular maior devido à formação de ligações cruzadas, ou menor devido à hidrólise. Provavelmente, a grande variação nos rendimentos de PCS-Co é

resultado destas alterações influenciando, dessa maneira, na precipitação das pectinas.

Nos trabalhos de Mañas e Saura-Calixto (1993 e 1995) e Mañas e col. (1993), os estudos mostram que, quando a pectina é constituída por cadeias longas e ramificadas, o álcool não consegue desidratá-las, não ocorrendo, portanto, a sua precipitação. Mas, se a pectina estiver muito hidrolisada, também, não precipitará por estar muito solúvel. Em ambos os casos, ocorre perda de material durante o processo de precipitação. Por outro lado, enzimas e sais provenientes dos tampões de extração, bem como os produzidos no processo de acerto de pH do meio, também, podem ser arrastados devido ao seu aprisionamento na estrutura das pectinas ocasionando um falso aumento de rendimento da PCS. Há também a possibilidade de termos obtido somente porções de pectina de tamanho médio na PCS-Co, capazes de serem desidratadas e precipitadas. Para evitar os problemas provenientes do arraste de sais e minimizar a perda de material pelo tratamento com etanol, seria mais adequado obter a PCS-Co (ou mesmo a PCS-Te) por diálise, não por precipitação a frio com etanol. Além disso, seria necessário passar os produtos obtidos da diálise por uma coluna de filtração em gel (peneira molecular) e/ou por coluna de cromatografia de troca iônica para separar seus constituintes e eliminar as enzimas utilizadas no processo de extração da parede celular.

Em resumo, as alterações de rendimento de PCS-Co ocorridas não podem ser analisadas quantitativamente. A presença de alterações nos rendimentos de polissacarídeos podem significar alterações sofridas na estrutura dos polissacarídeos da parede celular, provocando mudanças na solubilidade e na estereoquímica das pectinas, podendo ocasionar erros de interpretação.

Em relação à parede celular do tegumento, não observamos alterações consideráveis nos rendimentos obtidos da extração. O rendimento de PCI-Te em todos tempos e tipos de armazenamento,

praticamente não variou, ficando em torno de 70%. Na PCS-Te também não observamos diferenças nos rendimentos obtidos, que ficaram em torno de 5,5% à 9,3% (**Figura 13**).

Figura 12: Rendimento de parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C. Dados extraídos da Tabela 5 (em anexo)

Figura 13: Rendimento da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C. Dados obtidos da Tabela 6 (em anexo)

5.4.- Caracterização química da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Em relação à quantidade de proteína, o seu conteúdo na PCI-Co e PCS-Co de feijões armazenados a 4°C não variou (Tabela 4 e Figura 14). Porém, a proporção de proteína na PCI-Co de feijões armazenados a TA reduziu em 43,9% após 24 meses e aumentou em 35,1% na PCS-Co. A proporção de proteína em feijões armazenados a 37°C, também alterou-se com o passar do tempo, caindo 8,9% na PCI-Co e aumentando 26,2% na PCS-Co (Tabela 4 e Figura 14).

Tabela 4: Principais alterações observadas no conteúdo de proteínas na parede celular solúvel (PCS-Co) e insolúvel (PCI-Co) do cotilédone nos três tipos de armazenamento.

Armazenamento	Conteúdo de proteína	
	PCI-Co	PCS-Co
4°C	inalterado	inalterado
TA	redução 43,9%	aumento 35,1%
37°C	redução 8,9%	aumento 26,2%

TA = temperatura ambiente

Pela literatura (WILSON e FRY, 1986) verificamos que sob situação de estresse, as plantas apresentam aumento da síntese de proteína da parede celular. A extensina é secretada do citoplasma na forma solúvel e, posteriormente é polimerizada na parede celular formando uma matriz insolúvel através da formação de ligações cruzadas interpeptídicas, tipo isoditrosina (ligação difenil éter) na presença de uma peroxidase. Contudo, nas sementes, principalmente as armazenadas em locais relativamente secos, o conteúdo de umidade é muito baixo para que haja síntese de proteínas.

Neste caso, o aumento no conteúdo de proteína na PCS-Co (Tabela 4 e Figura 14) pode ter sido causada pelo aumento de proteínas do citoplasma hidrolisadas devido ao envelhecimento, que vieram a contaminar o material obtido mediante precipitação com etanol. Quanto à diminuição da quantidade de proteína na PCI-Co (Tabela 4 e Figura 14), verificada através de

determinação pelo método do ácido bicinconínico, pode ser explicada pelo fato de que a proteína após a sua síntese é depositada na parede celular, onde dá-se a formação de ligações cruzadas entre os polímeros através das unidades de tirosina. Neste caso, o aminoácido não estaria disponível para reduzir o Cu^{2+} e reagir com o ácido bicinconínico, desenvolvendo a coloração prevista na reação. Outros aminoácidos como a cisteína, cistina e triptofano poderiam estar envolvidos na reação de cor, mas tudo indica que estes aminoácidos estão em pequena quantidade na molécula de extensina.

Figura 14: Perfil de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédono de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C. Dados extraídos das Tabelas 9,10 e 11 (em anexo).

Por outro lado, Srisuma e col. (1989) verificaram que há aumento no conteúdo de fenólicos livres com o envelhecimento dos feijões. Desta forma, os fenólicos poderiam estar interferindo no método de determinação de proteínas, causando superestimação dos valores encontrados, principalmente, na PCS onde aparecem em maior quantidade.

O fato de não conhecermos os valores reais de PCS-Co e PCS-Te (devido aos problemas de precipitação e arraste de sais comentado no item 5.3), prejudica a análise dos resultados obtidos pela cromatografia quando analisados em $\mu\text{g}_{\text{açúcar}}/\text{mg}_{\text{parede}}$. Limitaremos, portanto a analisar os dados somente em porcentagem de açúcares, eliminando dessa forma os erros provenientes da presença de sais e enzimas e de perda de material.

Em relação à composição de açúcares, aparentemente, a PCI-Co e PCS-Co de feijões armazenados a 4°C mostraram um perfil irregular (**Figuras 15 e 16**). Não verificamos, também, alterações na composição de açúcares na PCS-Co e PCI-Co de feijões armazenados a TA até o período de 8 meses (**Figuras 17 e 18**). Contudo, após 24 meses ocorrem mudanças na composição de açúcares da PCI-Co e PCS-Co, como podemos ver em resumo no **Quadro 2**:

Na PCI-Co		Na PCS-Co:	
1. Aumento na porcentagem		1. Aumento na porcentagem	
ácidos urônicos	54,3%	ácidos urônicos	64,8%
arabinose	44,8%	galactose	46,4%
xilose	38,6%	manose	85,9%
2. Diminuição na porcentagem		2. Diminuição na porcentagem	
glicose	64,0%	xilose	75,4%
		arabinose	40,2%
		glicose	17,1%

Quadro 2: Resumo das principais alterações observadas na composição de açúcares da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA), após 24 meses.

A PCI-Co de feijões armazenados a TA apresenta aumento na proporção de ácidos urônicos, arabinose e xilose. Na PCS-Co, diminuição na proporção de arabinose e xilose (**Figura 17**). Isto pode significar que os polissacarídeos compostos por estes açúcares (arabinoramnogalacturonanos altamente ramificadas, contendo resíduos xilopiranosil) insolubilizaram-se devido à formação de ligações cruzadas e ficaram retidas na porção PCI-Co.

Em relação aos feijões armazenados a 37°C (**Figuras 19 e 20**), verificamos que após 6½ meses apresentavam alterações na composição de açúcares muito parecidas com o apresentado por feijões TA, como pode ser observado no **Quadro 3**. Constatou-se na PCI-Co, um aumento no conteúdo de ácidos urônicos, arabinose e xilose e redução no conteúdo de glicose. Verificamos na PCS-Co, redução no conteúdo de arabinose, xilose e ácidos urônicos, e aumento no conteúdo de manose, glicose e galactose.

PCI-Co:		PCS-Co:	
1. Aumento na porcentagem de:		1. Aumento na porcentagem de:	
ácidos urônicos	42,9%	manose	114,5%
galactose	38,9%	glicose	59,8%
arabinose	31,7%	galactose	30,4%
xilose	27,2%		
2. Diminuição na porcentagem de:		2. Diminuição na porcentagem de:	
glicose	48,6%	arabinose	15,9%
		xilose	24,3%
		ácidos urônicos	22,1%

Quadro 3: Resumo das principais alterações observadas na composição de açúcares da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédono de feijões armazenados a 37°C após 6 ½ meses.

Concluimos, portanto, que pode estar havendo insolubilização dos polissacarídeos em feijões armazenados a 37°C, de forma semelhante ao ocorrido com os feijões armazenados a TA. Estes polímeros seriam constituídos por arabinoramnogalacturonanos ricos em resíduos de xilose, que acreditamos serem porções integrante da parede celular do feijão (como comentado no item .5.2).

Figura 15: Porcentagem de açúcares na parede celular insolúvel (PCI-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 9 (em anexo)

Figura 16: Porcentagem de açúcares na parede celular solúvel do cotilédone (PCS-Co) de feijões armazenados à 4°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal= galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 9 (em anexo).

Figura 17: Porcentagem de açúcares na parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA). Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 10 (em anexo).

Figura 18: Porcentagem de açúcares da parede celular solúvel do cotilédone (PCS-Co) de feijão armazenado a temperatura ambiente TA. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal= galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 10 (em anexo).

Figura 19: Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 37°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal= galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 11 (em anexo).

Figura 20: Porcentagem de açúcares na parede celular solúvel do cotilédone (PCS-Co) de feijões armazenados a 37°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 11 (em anexos).

5.5.- Caracterização química da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

O quadro abaixo, mostra em resumo, o conteúdo de açúcares presentes na PCI e PCS do tegumento, nas três condições de armazenamento.

PCI-Te:	PCS-Te:
ácidos urônicos (23-61%)	ácidos urônicos (11-57%)
xilose (24-39 %)	xilose (7-18%)
arabinose (11-27 %)	arabinose (16-50%)
glicose (2-7 %)	glicose (2-7%).
galactose (1-6 %).	galactose (5-12%)
	manose (5-15%)

Quadro 4: Resumo dos principais açúcares contidos na parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento, nas três condições de armazenamento.

A quantidade elevada de ácidos urônicos (**Figuras 22-27**) e proteína (**Figura 21**) observada nas amostras de tegumento, devem-se provavelmente à interferência dos compostos fenólicos (abundantes neste tecido) nos métodos de análise.

Neste caso, o procedimento ideal para determinar o conteúdo de ácidos urônicos, seria obtendo-os mediante diferença através da conversão destes em galactose. Este método consiste na transformação dos ácidos urônicos livres em éster na presença de carbodiimida, reduzindo-os a frio na presença de concentrações elevadas de boroidreto deuterado (TAYLOR e CONRAD, 1972, KIM e CARPITA, 1991). Os polissacarídeos, assim reduzidos, são submetidos à diálise, liofilização, hidrólise e conversão a acetato de alditol. Pela diferença entre o polissacarídeo reduzido e o não reduzido podemos calcular a quantidade de açúcares ácidos.

Para determinar o conteúdo de proteína da parede celular, seria mais adequado realizá-lo pela determinação de hidroxiprolina (DROZD,

KUCHARZ, SZYJA, 1976), cujo aminoácido é encontrado quase que exclusivamente na extensina.

Figura 21: Perfil de proteína na parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Figura 22: Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do tegumento (PCI-Te) de feijões armazenados a 4°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 12 (em anexo).

Figura 23: Porcentagem de açúcares parede celular solúvel do tegumento (PCS-Te) de feijões armazenados a 4°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 12 (em anexo).

Figura 24: Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do tegumento (PCI-Te) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA) Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 13 (em anexo).

Figura 25: Porcentagem de açúcares na parede celular solúvel do tegumento (PCS-Te) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA). Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 13 (em anexo).

Figura 26: Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do tegumento (PCI-Te) de feijão armazenado a 37°C Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 14 (em anexo).

Figura 27: Porcentagem de açúcares da parede celular solúvel do tegumento (PCS-Te) de feijão armazenado a 37°C Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos da Tabela 14 (em anexo).

5.6.- Polissacarídeos obtidos do fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Em feijões armazenados a 4°C, observamos alterações mais evidentes na composição dos polissacarídeos somente após 24 meses de armazenamento (**Figura 28**). Essas mudanças no perfil de fracionamento podem estar relacionadas com alterações ocorridas na estrutura da parede celular dos feijões. O rendimento obtido pela solubilização com NaOH 0,01N e 4N foi consideravelmente baixo após 24 meses, quando comparado ao controle. Por outro lado, as frações ricas em hemicelulose, obtida pela solubilização com NaOH 1,0 N é a que apresentam maior rendimento neste mesmo período (**Figura 28**).

Figura 28: Perfil de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C. CEL = celulose; HNE = hemiceluloses não extraíveis; 0,01-4N=frações obtidas nas respectivas normalidades e CDTA= fração obtida pela extração com CDTA. Dados extraídos da **Tabela 15** (em anexo).

O perfil do fracionamento de feijões armazenados a TA é diferente do obtido de feijões 4°C e não apresenta mudanças até o período

de 8 meses (Figura 29). Porém, após 24 meses o rendimento em relação ao controle apresenta o seguinte perfil: aumento nas frações 0,05 N (78,7%), 4,0 N (38,8%), CEL (36,9%), HNE (25,9%) e 0,01 N (21,4%), e redução nas frações 0,5N (57,1%) e 1,0 N (48,2%).

Pela Figura 29, verificamos que houve um aumento das frações ricas em pectinas, principalmente as frações 0,01N e 4,0N. Isto pode significar que, parte das pectinas que deveriam ter permanecido na PCS-Co, tiveram sua solubilidade alterada devido à formação de ligações cruzadas. Isto teria tornado as pectinas menos solúveis, retendo-as na PCI-Co. Este comportamento pode ser traduzido pela diminuição no conteúdo de arabinose e xilose, observado na PCS-Co, seguido pelo aumento concomitante dos mesmos na PCI-Co, como foi visto nas Figuras 17 e 18 em feijões armazenados à TA.

Figura 29: Perfil de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA). CEL = celulose; HNE = hemiceluloses não extraíveis; 0,01-4N=frações obtidas nas respectivas normalidades e CDTA= fração obtida pela extração com CDTA. Dados extraídos da Tabela 16 (em anexo).

As frações 0,5 e 1,0N, ricas em hemicelulose (**Figura 29**), apresentaram uma redução acentuada, que pode ser explicada pelo acréscimo de material péctico à PCI-Co, tornando menor a proporção de hemicelulose encontrada na PCI-Co. A hemicelulose também pode ter-se insolubilizado, ficando retida na fração HNE, como pode ser observado pelo aumento (17,4%) de rendimento dessa fração (**Figura 29**). O estudo do perfil de açúcares da fração HNE poderia explicar melhor a insolubilização da hemicelulose provocada pelo armazenamento.

O fracionamento da PCI-Co de feijão armazenado a 37°C (**Figura 30**) foi semelhante ao de feijão armazenado a TA, apresentando, após 6 ½ meses, o seguinte perfil: aumento nas frações CDTA (21,2%), 0,01N (78,9%), 0,05N (88,8%), HNE (33,8%), CEL (10,0%) e redução nas frações 0,5 N (43,8%) e 1,0 N (46,1%)

Figura 30: Perfil de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 37°C. CEL = celulose; HNE = hemiceluloses não extraíveis; 0,01-4N=frações obtidas nas respectivas normalidades e CDTA= fração obtida pela extração com CDTA. Dados extraídos da **Tabela 17** (em anexo).

A fração 4N (**Figura 30**), porém, não apresentou aumento de rendimento, como foi observado em feijões armazenados a TA, após 24 meses. A fração CDTA também apresentou um aumento de rendimento (**Figura 30**), que não foi observado no fracionamento da PCI-Co de feijões armazenados a TA (**Figura 29**). Além disso, a observação mais importante que fica, é, mais uma vez, o aumento das frações ricas em pectinas, seguida pela redução das frações ricas em hemicelulose.

Como foi visto anteriormente, o perfil de açúcares da PCS-Co de feijões armazenados a 37°C (**Figura 20**) mostrou, também, uma diminuição nas quantidades de ácidos urônicos, arabinose e xilose, seguida por aumento concomitante desses mesmos açúcares na PCI-Co (**Figura 19**).

5.7.- Caracterização química dos polissacarídeos obtidos do fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Segundo a **Figura 31**, os polissacarídeos extraídos com CDTA eram compostos, principalmente, por: arabinose (44-58%), ácidos urônicos (16-26%), glicose (6-20%), xilose (7-13%) e galactose (6-8%),

Segundo a **Figura 32** os polissacarídeos solubilizados com NaOH 0,01N eram compostos, principalmente, por: arabinose (41-60%), ácidos urônicos (22-32%), xilose (10-11%), glicose, galactose e manose (aproximadamente 6%)

Nas concentrações de NaOH 0,5 e 1,0 N (**Figura 33 e 34**) obtivemos, principalmente, polissacarídeos compostos por glicose (90%).

Segundo a **Figura 35**, os polissacarídeos que obtivemos com NaOH 4N (22-41% do total) eram compostos em sua maioria por: arabinose (51-64%), ácidos urônicos (11-19%) e xilose (8-11%)

Figura 31: Porcentagem de açúcares da fração CDTA obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos das Tabelas 18, 19 e 20 (em anexo).

Figura 32: Porcentagem de açúcares da fração 0,01N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos das Tabelas 18, 19 e 20 (em anexo).

Figura 33: Porcentagem de açúcares da fração 0,5N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos das Tabelas 18, 19 e 20 (em anexo).

Figura 34: Porcentagem de açúcares da fração 1,0N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glucose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos das Tabelas 18, 19 e 20 (em anexo).

Figura 35: Porcentagem de açúcares da fração 4,0N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C. Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos. Dados extraídos das Tabelas 18, 19 e 20 (em anexo).

Ao analisarmos os polissacarídeos obtidos pelo fracionamento da PCI-Co de feijões armazenados a TA, verificamos que estes apresentavam alterações visíveis no rendimento e na composição de açúcares (**Figuras 29 e 31-35**). Após 24 meses, os feijões armazenados a TA, apresentaram um aumento de rendimento, principalmente das frações 4N (38,8%) e 0,01N (21,4%), ricas em pectinas (**Figura 29**). Estas frações e a fração CDTA, apresentaram, por sua vez, um aumento no conteúdo de arabinose e xilose após o mesmo período de tempo (**Figuras 31, 32 e 35**). Ao mesmo tempo, o conteúdo de glicose na PCI-Co alterou-se, apresentando redução no rendimento das frações 0,5N (57,1%) e 1N (48,2%), ricas em hemicelulose (**Figura 29**). Estas mesmas frações, apresentaram concomitantemente, redução no conteúdo de glicose (**Figuras 33-34**).

O aumento no conteúdo de arabinose, ácido urônicos e xilose na PCI-Co de feijões armazenados a TA (**Figura 17**), pode significar que houve formação de ligações cruzadas, provocando insolubilização e arraste de pectinas contendo grandes ramificações de arabinose e xilose. Isto provocaria diminuição na proporção de glicose na PCI-Co (**Figura 17**), devido ao aumento no conteúdo de pectinas. Este comportamento, pode ser visto facilmente, através das alterações comentadas acima.

Os feijões armazenados a 37°C apresentaram aumento no conteúdo de arabinose, xilose e ácidos urônicos na PCI-Co (**Figura 19**) de forma semelhante aos feijões armazenados a TA, significando que as pectinas de sua parede celular também se insolubilizaram. Nos feijões armazenados a 37°C, houve aumento considerável de rendimento das frações CDTA (21,2%) e 0,01N (78,9%), ricas em pectinas (**Figura 30**), contudo, não verificamos muita variação na composição de açúcares em cada fração da PCI-Co analisada (**Figuras 31-35**). Houve uma redução nas proporções das frações 0,5N (43,8%) e 1,0N (46,1%), ricas em hemicelulose (**Figura 30**), provavelmente, devido à insolubilização e arraste das pectinas para a PCI-Co, como foi comentado acima.

Com relação aos feijões armazenados a 4°C, não verificamos qualquer alteração na composição dos açúcares em qualquer uma das frações analisadas (**Figuras 31-35**). O feijão armazenado a 4°C não apresentou endurecimento, contudo apresentou outros tipos de modificações e não podem ser consideradas como controle. Basta observar as mudanças no perfil de fracionamento que obtivemos (**Figura 28**) e o desenvolvimento anormal apresentado por estas sementes após a germinação.

Sabe-se que as sementes podem ser armazenadas por períodos longos sob condições de baixa temperatura e umidade relativa (UR). Zhang e col. (1995) cita artigos no qual se observa que mesmo nestas condições as sementes acabam deteriorando gradualmente e perdendo finalmente a viabilidade. Neste trabalho, Zhang e col. (1995) estudam o envelhecimento de soja, analisando o seu metabolismo sob diferentes UR e temperaturas. Neste estudo, verificou-se que à UR de 33-68% e/ou temperaturas abaixo de zero pode haver deterioração das sementes após um período longo de tempo devido à ação tóxica de acetaldeído, um intermediário produzido na fermentação alcoólica. Como as sementes continuam respirando e sua atividade metabólica não é nula, logicamente ocorrem alterações.

Os feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C comportaram-se de formas diferentes, contudo os feijões TA e 37°C apresentaram algumas semelhanças. Todos os feijões analisados apresentaram grande quantidade de material péctico insolúvel que foi extraído principalmente por concentrações de hidróxido 4N e 0,01N e solução de CDTA. As hemiceluloses foram extraídas com concentrações de hidróxido 1N e 0,5N. Os feijões TA e 37°C apresentaram aumento no conteúdo de material péctico na porção insolúvel da parede (PCI-Co), traduzido pelo aumento no conteúdo de arabinose, xilose e ácidos urônicos e das frações CDTA, 0,01N e 4N ricos neste material. Apesar de se verificar aumento na concentração de arabinose nas frações acima citadas em feijões TA e 37°C, isto ficou mais evidente somente na parede celular de feijões armazenados a TA.

O endurecimento observado nas sementes armazenadas a TA e 37°C, podem estar relacionadas, em parte, com a insolubilização das

pectinas, contribuindo com a impermeabilização e enrijecimento da mesma. Aparentemente, estas alterações parecem estar mais associadas com o envelhecimento, e não com o endurecimento, visto que, os feijões armazenados a TA por 24 meses apresentaram maior insolubilização de pectinas em relação a feijões armazenados a 37°C por 6 ½ meses, mas o seu aumento no tempo de cocção foi menor (130% em relação aos 688% de feijões armazenados a 37°C).

6.- CONCLUSÕES

A PCI-Co de feijões controle era composta principalmente por polissacarídeos solubilizados com NaOH 4N, composto por arabinose, xilose e ácidos urônicos e com NaOH 0,5 e 1N composto, principalmente, de glicose. As frações solubilizadas com CDTA e NaOH 0,01N, presentes em menor quantidade, também eram compostas, principalmente, de arabinose, xilose e ácidos urônicos. Esta composição, contudo, apresentou algumas variações após o envelhecimento.

Feijões armazenados a temperatura ambiente (TA) e 37°C apresentaram aumento no tempo de cocção e redução na germinação. A PCI-Co de feijões armazenados TA e a 37°C passaram a apresentar maior conteúdo de pectinas e menor de hemicelulose com o tempo. Por outro lado, a PCS-Co passou a apresentar menor conteúdo de pectinas. Contudo, o mesmo não ocorreu com feijões armazenados a 4°C.

Com o envelhecimento, feijões armazenados a TA, apresentaram aumento de rendimento das frações 4N, 0,01N, 0,05N, ricas em pectinas e redução das frações 0,5N e 1N, ricas em hemicelulose. Em feijões armazenados a 37°C, houve aumento de rendimento das frações CDTA, 0,01N, 0,05N, composta principalmente por pectinas e redução nas frações 0,5N e 1N, compostas por hemicelulose. A análise dos açúcares nas frações demonstrou que somente em feijões TA, a composição de açúcar foi afetada de forma visível.

Feijões armazenados a 4°C não apresentaram alterações no tempo de cocção nem de germinação, ou na composição de açúcares em cada fração analisada. Os feijões apresentaram aumento no tempo de cocção e insolubilização de pectinas com o decorrer do tempo. Entretanto, as alterações apresentadas no conteúdo de pectina na PCI-Co, parecem estar mais relacionadas com o longo período de armazenamento, do que com o endurecimento do grão.

7.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABDEL KADER, Z.M. Study of some factors affecting water absorption by faba beans during soaking. *Food Chem.*, London, v.53, p. 235-238, 1995.
02. ABDUL-KADIR, R., BARGMAN, T.J., RUPNOW, J.H. Effect of infrared heat processing on rehydration rate and cooking of *Phaseolus vulgaris* (Var. Pinto). *J. Food Sci.*, Chicago, v. 55, n. 5, p. 1472-3, 1990.
03. 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.
04. 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.
05. ALKORTA, I., LLAMA, M.J., SERRA, J.L. Interference by pectin in protein determination. *Lebensm. Wiss. Technol.*, London, v. 27, p. 39-41, 1994.
- 0.6. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 13. ed. Washington: AOAC, 1980. p. 858.

07. BAUER, W.D., TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., ALBERSHEIN, P. The structure of plant cell walls. *Plant Physiol.*, Bethesda, v. 51, p. 174-187, 1973.
08. BERNAL-LUGO, I., CASTILLO, A., DIAZ DE LEON, F., MORENO, E., RAMÍREZ, J. Does phytic acid influence cooking rate in common beans? *J. Food Biochem.*, Westport, v. 15, p. 367-374, 1991.
09. BERNAL-LUGO, I., PRADO, G., PARRA, C., MORENO, E., RAMÍREZ, J., VELAZCO, O. Phytic acid hydrolysis and bean susceptibility to storage induced hardening. *J. Food Biochem.*, Westport, v. 14, p. 253-261, 1990.
10. 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, 1983.
11. 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.
12. BOUDART, G., DECHAMP-GUILLAUME, G., LAFITTE, C., RICART, G., BARTHE, J.P., MAZAU, D., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. *Eur. J. Biochem.*, Berlín, v. 232, p. 449-457, 1995.
13. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 72, p. 248-254, 1976.
14. 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.
15. BRESSANI, R. Grain quality of common beans. *Food Rev. Int.*, New York, v. 9, n. 02, p. 237-297, 1993.

16. BRESSANI, R., ELIAS, L. G. Nutritional value of legume crops for human and animal. In: SUMMERFIELD, R. J., BUNTING, H. eds. ***Advances in legume science***. London: Royal Botanical Garden, 1978. p. 135-155.

17. BRESSANI, R., BENAVIDES, V., CALDERÓN, E., ORTÍZ, M.A., CHON, C. Evaluation of bush and vine black beans for physical, chemical and nutritional characteristics. ***Arch. Latinoam. Nutr.***, Caracas, v.45,n. 2, p. 140-144, 1995.

18. BRESSANI, R., CHON, C. Effects of altitude above sea level on the cooking time and nutritional values of common beans. ***Plant Foods Human Nutr.***; Dordrecht, v.49, p. 53-61, 1996.

19. BRESSANI, R., NAVARRETE, D.A., SOTO, A.G., ELÍAS, L.G. Culinary practices and consumption characteristics of common beans at the rural home level. ***Arch. Latinoam. Nutr.***, Caracas, v. 38, p. 925-934, 1988.

20. BRILLOUET, J. M., CARRÉ, B. Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Glycine max*. ***Phytochemistry***, New York, v.22, p. 841-843, 1983.

21. BRILLOUET, J. M., ROUAU, X., HOEBLER, C., BARRY, J.L., CARRÉ, B., LORTA, E. A new method for determination of insoluble cell walls and soluble nonstarchy polysaccharides from plant materials. ***J. Agric. Food Chem.***, Washington, v.36, p. 969-979, 1988.

22. CARPITA, N. C. Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. ***Phytochemistry***, New York, v.23, n. 05, p. 1089-1093, 1984.

23. CARPITA, N. C. Hemicellulosic polymers of cell walls of *Zea coleoptiles*. ***Plant Physiol.***, New York, v.72, p. 515-521, 1983.

24. CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. ***Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.***, Palo Alto, v. 47, p. 445 - 76, 1996.

25. 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.
26. 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.
27. CARPITA, N.C., WHITTERN, D. A highly substituted glucuronoarabinoxylan from developing maize coleoptile. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 146, p. 129-140, 1986.
28. 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.
29. CHAMP, M., BRILLOUET, J.M., ROUAU, X. Non starchy polisaccharides of *Phaseolus vulgaris*, *Lens esculenta*, and *Cicer arietinum* seeds. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 34, p. 326-329, 1986.
30. DE LEÓN, L.F., ELÍAS, L.G., BRESSANI, R. Effects of salt solutions on the cooking time, nutritional and sensory characteristics of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Res. Int.*, Essex, v. 25, p. 131-136, 1992.
31. DEL VALLE, J.M., STANLEY, D.W. Reversible and irreversible components of bean hardening. *Food Res. Int.*, Essex, v. 28, n. 05, p. 455-463, 1995.
32. DEL VALLE, J.M., STANLEY, D.W., BOURNE, M.C. Water absorption and swelling in dry bean seeds. *J. Food Process. Preserv.*, Westport, v. 16, p. 75-98, 1992.

33. DROZDZ, M., KUCHARZ, E., SZYJA, J. A colorimetric micromethod for determination of hydroxyproline in blood serum. **Z. Med. Labortech.**, Berlin, v. 17, p. 163-171, 1976
34. 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.
35. ENGLYST, H.N., QUIGLEY, M.E., HUDSON, G.J. Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugar. **Analyst**, London, v. 119, p. 1497-1509, 1994.
36. FILISETTI-COZZI, T.M.C.C., CARPITA, N.C. Measurement of uronic acid without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v. 197, p. 157-162, 1991.
37. FRANCO, T.T., RODRIGUES, N.R., SERRA, G.E., PANEGASSI, V.R., BUCKERIDGE, M.S. Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and the formation of aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 680, p. 255-261, 1996.
38. FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annu. Rev. Plant Physiol.** Palo Alto, v. 37, p. 165-86, 1986.
39. FRY, S. C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. **Planta**, Berlin, v. 157, p. 11-123, 1983.
40. GARCIA, E. **Caracterização ultraestrutural e histoquímica comparativa de feijões (*Phaseolus vulgaris*) normais e endurecidos**. São Paulo, 1990. [Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP]
41. 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.

42. GARCIA, E., LAJOLO, F.M., SWANSON, B.G. A comparative study of normal and hard-to-cook brazilian common bean (*Phaseolus vulgaris*): Ultrastrutural and histochemical aspects. **Food Struct.**, Chicago, v. 12, p. 147-154, 1993.
43. GARCIA-VELA, L. A., DEL VALLE, J.M., STANLEY, D. W. Hard-to-cook defect in black beans: The effect of soaking in various aqueous salt solutions. **Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.**, Ottawa, v. 24(1/2), p. 60-67, 1991.
44. 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.
45. GIDROL, X., NOUBHANI, A., MOCQUOT, B., FOURNIER, A., PRADET, A. Effect of accelerated agging on protein synthesis in two legume seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, Paris, v. 26, n. 3, p. 281-288, 1988.
46. 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, 1994.
47. 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, 1994.
48. 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.
49. HINCKS, M. J., STANLEY, D. W. Multiple mechanisms of bean hardening. **J. Food Technol.**, Chicago, v. 21, p. 731-750, 1986.

50. HINCKS, M. J., STANLEY, D. W. Lignification: Evidence for a role in hard-to-cook beans. *J. Food Biochem.*, Westport, v. 11, p. 41-58, 1987.
51. 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.
52. HSIEH, H.M., POMERANZ, Y., SWANSON, B.G. Composition, cooking time, and maturation of Azuki (*Vigna angularis*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal Chem.*, St. Paul, v. 69, n. 3, p. 244-248, 1992.
53. HUNG, Y.C., McWATTERS, K.H., PHILLIPS, R.D., BEUCHAT, L.R., CHINNAN, M.S. Physicochemical, microbiological, and akara-making properties of hard-to-cook cowpeas. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 43, p. 989-992, 1995.
54. 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.
55. 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.
56. IYAMA, K., LAM, T. B.T., STONE, B.A. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internods. *Phytochemistry*, New York, v. 29, n. 3, p. 733-737, 1990.
57. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. In: Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1985, v. 1, 3ª ed., p. 125.
58. 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.

59. JOSEPH, E. CRITES, S.G., SWANSON, B.G. Microestructure of black, green and red gram. **Food Struct.**, Chicago, v. 12, p. 155-162, 1993.
60. KHALIL, A.H., MANSOUR, E.H. The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. **Food Chem.**, London, v.54, p. 177-182, 1995.
61. 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.
62. KIM, J.B., CARPITA, N.C. Changes in esterification of uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. **Plant. Physiol.**, Copenhagen, v.98, p. 646-653, 1992.
63. KYRIAKIDIS, N.B., APOSTOLIDIS, A., PAPAZOGLU, L.E., KARATHANO, V.T. Physicochemical studies of hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*). **J. Sci. Food Agric.** London, v. 74, p.186-192, 1997
64. (Apud):LEBEDEFF, G.A. Studies on the inheritance of hard seeds in beans. **J. Agric. Res.**, Lahore, v.74, p. 205-215, 1947.
65. LÉON, L.F. ELÍAS, L.G., BRESSANI, R. Effect of salt solutions on the cooking time, nutritional and sensory characteristics of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Res. Int.**, Essex, v. 25, p. 131-136, 1992.
66. LEPRINCE, O., VERTUCCI, C.W., HENDRY, G.A.F., ATHERTON, N.M. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 94, p. 233-240, 1995
67. LIU, K., 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.

68. LIU, K, McWATTERS, K.H., PHILLIPS, R.D., Protein insolubilization and thermal destabilization during storage as related to hard-to-cook defect in cowpeas. *Agric. Food Chem.*, Washington, v. 40, n.12, p. 2483-2487, 1992b.
69. LIU, K, PHILLIPS, R.D., HUNG, Y. Development of hard-to-cook defect in cowpeas: role of pectin methylesterase. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 40, n. 6 p. 949-952, 1992b.
70. LIU, K, PHILLIPS, R.D., McWATTERS, H., Mechanism of pectin changes during soaking and heating as related to hard-to-cook defect in cowpeas. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 41, n. 9, p. 1476-1480, 1993.
71. LIU, K, McWATTERS, K.H. Effects of storage, soaking and cooking method on cookability of cowpeas. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, London, v. 27, p. 95-97, 1994.
72. 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.
73. 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. Preserv.*, Westport, v. 17, p. 1-20, 1993.
74. MAÑAS, E., SAURA-CALIXTO, F. Dietary fibre analysis: methodological error sources. *Eur. J. Clin. Nutri.*, London, Suppl. 3, p. S158-S162, 1995.
75. MAÑAS, E., SAURA-CALIXTO, F. Ethanollic precipitation: a source of error in dietary fibre determination. *Food Chem.*, London, v. 47, p. 351-355, 1993.
76. MAÑAS, E., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F. Sources of error in dietary fibre analysis. *Food Chem.*, London, v. 50, p. 331-342, 1994.

77. 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.

78. MATTSON, S. The cookability of yellow pear: A colloid-chemical and biochemical study. *Acta Agric. Suecana II*, Stockholm, v. 2, p. 185-231, 1946.

79. McCANN, M. C., ROBERTS, K., WILSON, R.H., GIDLEY, M.J., GIBEAUT, D.M., KIM, J.B., CARPITA, N.C. Old and new ways to probe plant cell-wall architecture. *Can. J. Bot.*, Ottawa, v. 73, Suppl. 1, p. S103-S113, 1995.

80. McDOUGALL, G.J., MORRISON, I.M., STEWART, D., HILLMAN, J.R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 70, p. 133-150, 1996.

81. McLAUGHLIN, M. A., GAY, M.L. Differentiation of dietary fiber sources by chemical characterization. In: Furda, I., Brine, C.J. New developments in dietary fiber. Plenum, New York, 1990, p. 295-310.

82. MELITO, C., TOVAR, J. Cell walls limit in vitro protein digestibility in processed legume seeds. *Food Chem.*, London, v. 53, p. 305-307, 1995.

83. MICHAELS, T. E., STANLEY, D. W. Stability and inheritance of storage-induced hardening in 20 common bean cultivars. *Can. J. Plant Sci.*, Ottawa, v. 71, p. 641-647, 1991.

84. 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.

85. 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.

86. NYMAN, M.E., BJÖRCK, I.M. In vivo effects of phytic acid and polyphenols on the bioavailability of polysaccharides and other nutrients. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 54, n. 5, p. 1332-5;1363, 1989.
87. 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.
88. ORIZOBA, I.C. Effects of germination, dehulling and cooking on the nutritive value of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 54, n. 05, p. 1371-72, 1989.
89. 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.
90. PAREDES-LÓPEZ, O., CÁRABEZ-TREJO, A., PALMA-TIRADO, L., REYES-MORENO, C. Influence of hardening procedure and soaking solution on cooking quality of common bean. *Plant Foods Human Nutr.*, Dordrecht, v. 41, p. 155-164, 1991.
91. PAREDES-LÓPEZ, O.; HARRY, G.I. Changes in selected chemical and antinutritional components during tempeh preparation using fresh and hardened common beans. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 54, n. 4, p. 968-970, 1989.
92. PAREDES-LÓPEZ, O., HARRY, G.I., GONZALEZ-CASTAÑEDA, J. Sensory evaluation of tempeh produced by fermentation of common beans. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 40, n. 6, p. 123-126, 1990.
93. PAREDES-LÓPEZ, O., MAZA-CALVIÑO, E.C., GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, J. Effect of the hardening phenomenon on some physicochemical properties of common bean. *Food Chem.*, London, v.31, p. 225-236, 1989a.
94. 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.

95. PAREDES-LÓPEZ, O., REYES-MORENO, C. MONTES-RIVERA, R., CARABEZ-TREJO, A. Hard-to-cook phenomenon in common beans - influence of growing location and hardening procedures. *Int. J. Food Sci. Technol.*, Essex, v. 24, n. 5, p. 535-542, 1989b.
96. 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; 336, 1989.
97. PROSKY, L. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v. 71, p. 1017-1023, 1988.
98. RAO, P., PATTABIRAMAN, T. N. Further studies on the Mechanism of phenol-sulfuric acid reaction with furaldehyde derivatives. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 189, p. 178-181, 1990
99. RAO, P., PATTABIRAMAN, T. N. Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 181, p. 18-22, 1989.
100. 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.
101. 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.
102. 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.

103. 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.
104. 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.
105. ROBERTSON, D., Mc CORMACK, B.A., BOLWELL, G.P. Cell wall polysaccharide biosynthesis and related metabolism in elicitor-stressed cells of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biochem. J.*, London, v. 306, p. 745-750, 1995.
106. 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.
107. ROLSTON M.P., Water impermeable seed dormancy. *Bot. Rev.*, New York, v. 44, n. 3, p. 365-396, 1978.
108. 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.
109. 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.
110. SAIO, K. Soybean resistant water absorption. *Cereal Foods World*, St. Paul, v. 21, p. 168-173, 1976.
111. SANTOS GARRUTI, R., BOURNE, M.C. Effect of storage conditions of dry bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L) on texture profile parameters after cooking. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 50, p. 1067-1071, 1985.

112. SEFA-DEDEH, S., STANLEY, D.W., VOISEY, P.W. Effect of soakingtime and coocking conditions on texture and microstructure of cowpea (*Vigna unguiculata*). *J. Food Sci.*, Chicago, v.43, p. 1832-1838, 1978.
113. 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.
114. SELVENDRAN, R.R. Cell wall glycoproteins and polysaccharides of parenchyma of *Phaseolus coccineus*. *Phytochemistry*, New York, v. 14, p. 2175-2180, 1975.
115. SELVENDRAN, R.R. The chemistry of plant cell walls. In: BIRCH, G.G., PARKER, K. J. Dietary fibre. London: Applied Science, 1983, pg. 95-147.
116. SELVENDRAN, R.R., DAVIES, A.M.C., TIDDER, E. Cell wall glycoproteins and polysaccharides of runner beans. *Phytochemistry*, New York, v. 14, p. 2169-2174, 1975.
117. 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.
118. 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.
119. SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall - Review article. *Plant Cell*, Rockville, v. 5, p. 9-23, 1993.
120. SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 150, p. 76-85, 1985.

121. SRISUMA, N., HAMMERSCHMIDT, R., UEBERSAX, M.A., RUENGSAKULRACH, S., BENNINK, M.R., HOSFIELD, G.L. Storage induced changes of phenolic acids and development of hard-to cook in dry beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Seafarer). *J. Food Sci.*, Chicago, v. 54, n. 21, p. 311-318, 1989.
122. 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.
123. STANLEY, D. W. A possible role for condensed tannins in bean hardening. *Food Res. Int.*, Essex, v. 25, p. 187-192, 1992
124. STANLEY, D.W., AGUILERA, J.M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes - The influence of structure and composition. *J. Food Biochem.*, Westport, v. 09, p. 277-323, 1985.
125. STANLEY, D. W., MICHAELS, T.E., PLHAK, L.C., CALDWELL, K.B. Storage-induced hardening in 20 common bean cultivars. *J. Food Qual.*, Westport, v. 13, p. 233-247, 1990.
126. 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.
127. STEEL, C.J., SGARBIERI, V.C., JACKIX, M.H. Use of extrusion technology to overcome undesirable properties of hard-to-cook dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 43, p. 2487-2492, 1995.
128. STOLLE-SMITHS, 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.
129. TALBOTT, L.D., RAY, P.M. Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, Bethesda, v. 98, p. 357-368, 1992.

130. TAKEUCHI, Y., NISHIYAUCHI, M., AOYAMA, K., SATO, A. Polysaccharides in primary cell walls of japanese cypress cells in suspension culture. *Phytochemistry*, New York, v. 41, n. 02, p. 461-463, 1996.

131. TAYLOR, R.L., CONRAD, H.E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, Washington, v.11, p. 1383-1388, 1972

132. UPDERGRAFF, D.M. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v.32, p. 420-424, 1969.

133. VARRIANO-MARTSON, E., JACKSON, G.M. Hard-to-cook phenomenon in beans. Structural changes during storage and inhibition. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 46, p. 1379-1385, 1981.

134. VERTUCCI, C. W., ROSS, E.E., CRANE, J. Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. *Ann. Bot.*, London, v. 74, p. 531-540, 1994.

135. 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. 08, p. 538,540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 1986.

136. WIECHELMAN, K.J., BRAUN, R.D., FITZPATRICK. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 175, p. 231-237, 1988.

137. WILSON, L.G., FRY, J.C. Extensin - a major cell wall glycoprotein. *Plant Cell Environ.*, Oxford, v.9, p. 239-260, 1986.

138. WHITCOMBE, A.J., O'NEIL, M.A., STEFFAN, W., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G. Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-II. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 271, p. 15-29, 1995.

139. 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.
140. ZIENA, H.M., YOUSSEF, M.M., EL-MAHDY, A.R. Amino acid composition and some antinutritional factors of cooked faba beans (medamnis): effects of cooking temperature and time. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 56, n. 05, p. 1347-1349, 1991.

8.- RELAÇÃO DE TABELAS E FIGURAS

8.1.- Figuras

- Figura 1:** Modelo demonstrando a contribuição de algumas enzimas no processo de endurecimento de leguminosas.
- Figura 2:** Modelo de mecanismo multicanal, mostrando eventos seqüenciais que levam ao HTC em leguminosas, segundo trabalho de Liu, K. (1995).
- Figura 3:** As possíveis ligações relacionadas com a insolubilização dos componentes da parede celular.
- Figura 4:** Fluxograma da extração de parede celular insolúvel (PCI), solúvel (PCS) e amido residual (AMR) do cotilédone e do tegumento de feijões pelo método enzimático-químico.
- Figura 5:** Reação do ácido bicinconínico
- Figura 6:** Determinação de ácidos urônicos.
- Figura 7:** Redução e acetilação de açúcares
- Figura 8:** Hidrólise e acetilação de açúcares neutros.
- Figura 9:** Fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co).
- Figura 10:** Fluxograma de extração, fracionamento e caracterização da parede celular de feijões controle e armazenados a 4°C, TA e 37°C.
- Figura 11:** Esquema mostrando os componentes da parede celular do cotilédone de feijão controle.
- Figura 12:** Rendimento de parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.
- Figura 13:** Rendimento da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.
- Figura 14:** Perfil de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

- Figura 15:** Porcentagem de açúcares na parede celular insolúvel (PCI-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C.
- Figura 16:** Porcentagem de açúcares na parede celular solúvel do cotilédone (PCS-Co) de feijões armazenados à 4°C.
- Figura 17:** Porcentagem de açúcares na parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA).
- Figura 18:** Porcentagem de açúcares da parede celular solúvel do cotilédone (PCS-Co) de feijão armazenado a temperatura ambiente TA.
- Figura 19:** Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 37°C.
- Figura 20:** Porcentagem de açúcares na parede celular solúvel do cotilédone (PCS-Co) de feijões armazenados a 37°C.
- Figura 21:** Perfil de proteína na parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.
- Figura 22:** Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do tegumento (PCI-Te) de feijões armazenados a 4°C.
- Figura 23:** Porcentagem de açúcares parede celular solúvel do tegumento (PCS-Te) de feijões armazenados a 4°C.
- Figura 24:** Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do tegumento (PCI-Te) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA)
- Figura 25:** Porcentagem de açúcares na parede celular solúvel do tegumento (PCS-Te) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA).
- Figura 26:** Porcentagem de açúcares da parede celular insolúvel do tegumento (PCI-Te) de feijão armazenado a 37°C.
- Figura 27:** Porcentagem de açúcares da parede celular solúvel do tegumento (PCS-Te) de feijão armazenado a 37°C.
- Figura 28:** Perfil de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C.

Figura 29: Perfil de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA).

Figura 30: Perfil de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 37°C.

Figura 31: Porcentagem de açúcares da fração CDTA obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C.

Figura 32: Porcentagem de açúcares da fração 0,01N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C.

Figura 33: Porcentagem de açúcares da fração 0,5N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C.

Figura 34: Porcentagem de açúcares da fração 1,0N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C.

Figura 35: Porcentagem de açúcares da fração 4,0N obtida do fracionamento da parede celular insolúvel de cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C.

8.2.- Quadros

Quadro 1: Tempo e temperatura de armazenamento das sementes.

Quadro 2: Resumo das principais alterações observadas na composição de açúcares da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) de feijões armazenados a temperatura ambiente (TA) após 24 meses.

Quadro 3: Resumo das principais alterações observadas na composição de açúcares da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 37°C após 6 ½ meses.

Quadro 4: Resumo dos principais açúcares contidos na parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento, nas três condições de armazenamento.

8.3.- Tabelas

Tabela 1: Umidade, germinação e tempo de cocção de feijões controle e armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C

Tabela 2: Conteúdo (%) de parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) do cotilédone e de produtos de fracionamento da PCI-Co em feijões controle com seus respectivos teores de açúcar.

Tabela 2.1: Conteúdo de açúcares neutros, ácidos urônicos, celulose, hemicelulose não extraíveis e proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co), solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) do cotilédone de feijões controle.

Tabela 3: Porcentagem de polissacarídeos da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento em feijões controle, com seus respectivos teores de açúcar.

Tabela 3.1: Conteúdo de açúcares neutros, ácidos urônicos e proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões controle.

Tabela 4: Principais alterações observadas no conteúdo de proteínas na parede celular solúvel e insolúvel (PCI-Co) do cotilédone nos três tipos de armazenamento.

Tabela 5: Rendimento (%) de parede celular insolúvel (PCI-Co), solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) no cotilédone de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Tabela 6: Rendimento (%) de parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Tabela 7: Conteúdo (µg/mg) de parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) do cotilédone e de produtos de fracionamento da PCI-Co em feijões controle com seus respectivos teores de açúcar.

Tabela 8: Conteúdo (µg/mg) de parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões controle e seus respectivos teores de açúcar.

- Tabela 9:** Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C.
- Tabela 10:** Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a TA.
- Tabela 11:** Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 37°C.
- Tabela 12:** Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C.
- Tabela 13:** Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a TA.
- Tabela 14:** Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 37°C.
- Tabela 15** Porcentagem de polissacarídeos obtidos no fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijão armazenado a 4°C
- Tabela 16:** Porcentagem de polissacarídeos obtidos no fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijão armazenado a TA
- Tabela 17:** Porcentagem de polissacarídeos obtidos no fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijão armazenado a 37°C
- Tabela 18:** Perfil de açúcares neutros e ácidos urônicos nos produtos de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C
- Tabela 19:** Perfil de açúcares neutros e ácidos urônicos nos produtos de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a TA

Tabela 20: Perfil de açúcares neutros e ácidos urônicos nos produtos de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijões armazenados a 37°C

9.- RESUMO

O feijão é considerado uma fonte importantes de nutrientes, para toda a população mundial, principalmente para os países em desenvolvimento. Porém, os feijões também possuem fatores antinutricionais e facilidade para adquirir defeitos texturais quando submetidos a condições inadequadas de armazenamento. Temperatura e umidade de armazenamento elevadas, desencadeiam o aparecimento do defeito textural conhecido como *hard-to-cook*, que provoca o endurecimento das sementes e inúmeras perdas econômicas e nutricionais. Para estudar este fenômeno, isolou-se a parede celular solúvel (PCS-Co) e insolúvel (PCI-Co) do cotilédone de feijões armazenados a 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C/75% umidade relativa (U.R.) e analisou-se a sua composição em açúcares. A PCI-Co foi fracionada com solução quelante de cálcio e com gradiente de hidróxido e analisadas quanto ao conteúdo de açúcares. A PCI-Co compõem 12,3% do cotilédone dos feijões controle e é formada principalmente de polissacarídeos solubilizados com NaOH 4N (29,4%), composto por arabinose (55,0%), xilose (10,3%) e ácidos urônicos (18,9%) e de polissacarídeos solubilizados com NaOH 0,5N (16,8%) e 1,0 N (17,2%), composto na sua maioria por glicose (92,1% e 90,7%). A PCS-Co compõem 9,0% do cotilédone em feijões controle e é constituída por arabinose (38,6%), ácidos urônicos (23,4%), galactose (12,7%) e xilose (11,2%). Esta composição apresentou alterações com o envelhecimento em feijões armazenados a TA e 37°C. A PCI-Co de feijões armazenados a TA e 37°C apresentaram aumento no conteúdo de arabinose (44,8% e 31,7%), ácidos urônicos (54,3% e 42,9%) e xilose (38,6% e 27,2%), provenientes de pectinas, e diminuição de glicose (64,0% e 48,6%), proveniente de hemicelulose. A PCS apresentaram redução, principalmente no conteúdo de arabinose (40,2% e 15,9%). Além disso, os feijões armazenados a TA e 37°C apresentaram aumento no tempo de cocção (2,3 e 8 vezes superior ao controle) e redução na germinação (17% e 100%). Isto pode significar que, com o envelhecimento, ocorreria insolubilização das pectinas, devido a formação de ligações cruzadas, contribuindo com o endurecimento dos feijões. Os feijões armazenados a 4°C apresentaram alterações na germinação e no perfil de fracionamento, mas não apresentaram alterações consideráveis na composição de açúcares da PCI-Co e PCS-Co.

10.- SUMMARY

Common beans is one of the most important source of nutrients for the world population, mainly in developing countries. Nevertheless, they have several undesirable characteristics, such as antinutrients components and facility to acquire textural defects when stored under inadequate conditions. High temperature and humidity of storage cause the development of hard-to-cook phenomenon, characterized by extended cooking time for cotyledon softening and responsible for economic and nutritional losses. In order to study this phenomenon, soluble cell wall material (SCWM) and insoluble cell wall material (ICWM) were isolated from cotyledons of beans stored at 4°C, room temperature (RT) and 37°C/75% relative humidity (RH) and analysed about their sugar composition. ICWM was fractionated with aqueous solutions of chelating agents and hidroxide solutions gradient. Each fractions were analysed about their sugar composition. Control beans cotyledon contained 12.3% of ICWM, composed mainly for polysaccharides solubilized by NaOH 4.0N (29.4%), composed in its majority of arabinose (55.0%), xylose (10.3%), uronic acid (18.9%) and polysaccharides solubilized by NaOH 0.5N (16.8%) and NaOH 1.0N (17.2%), composed in most part of glucose (92.1% and 90.7% respectively). About 9.0% of cell wall of control beans is composed by SCWM, that contain arabinose (38.6%), uronic acids (23.4%), galactose (12.7%) and xylose (11.2%). The cell wall composition showed alterations with aging in beans stored at RT and 37°C. Cotyledon ICWM of beans stored at RT and 37°C showed a increase in arabinose (44.8% and 31.7%), uronic acid (54.3% and 42.9%) and xylose contents (38.6% and 27.2%), originating of pectins and decrease of glucose contents (64.0% and 48.6%), probably originating by hemicellulose. SCWM showed reduction mainly in arabinose contents (40.2% and 15.9%). Besides, beans stored at RT and 37°C, showed increase in cooking time (2.3 and 8 times higher than control) and decrease in germinability (17% and 100%). It could be a indication of cross-linking formation and pectins insolubilization during aging, contributing with bean hardening. Beans stored at 4°C showed alterations in germinability and fractionation profile, but didn't show considerably alterations in cotyledon ICWM and SCWM sugar composition.

10.- ANEXOS

Tabela 5: Rendimento (%) de parede celular insolúvel (PCI-Co), solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) no cotilédono de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Tempo (meses)	PCI-Co	PCS-Co	AMR
% Armazenamento a 4°C			
controle	12,26 ±0,4	9,00 ±0,4	1,81
3½	10,09 ±1,1	9,27 ±0,5	1,47 ±0,4
6½	9,39 ±0,5	8,84 ±0,1	1,03 ±0,2
11	10,87 ±0,3	8,67 ±0,3	1,20 ±0,3
24	13,94 ±0,5	11,51 ±1,2	0,90 ±0,2
Armazenamento a TA			
controle	12,26 ±0,4	9,00 ±0,4	1,81
8	11,9 ±1,1	8,02 ±0,2	1,02 ±1,2
24	9,26 ±0,6	10,58 ±1,4	2,11 ± 0,3
Armazenamento a 37°C			
controle	12,26 ±0,4	9,00 ±0,4	1,81
2½	10,87 ±1,2	7,36 ±0,4	1,28
3½	11,07 ±0,9	7,17 ±0,3	1,85 ±0,1
6½	12,22 ± 0,4	5,42 ±0,5	1,61 ±0,3

TA= temperatura ambiente

Tabela 6: Rendimento (%) de parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C, TA e 37°C.

Tempo (meses)	PCI-Te %	PCS-Te
Armazenamento a 4°C		
controle	72,4	5,5
3½	67,6	8,4
6½	70,5	8,0
11	68,6	7,0
24	73,2	9,3
Armazenamento a TA		
controle	72,4	5,5
8	72,7	6,7
24	75,9	7,2
Armazenamento a 37°C		
controle	72,4	5,5
2½	69,0	7,7
3½	69,4	7,7
6½	72,9	7,7

TA= temperatura ambiente

Tabela 7: Conteúdo ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) e amido residual (AMR) do cotilédone e de produtos de fracionamento da PCI-Co em feijões controle com seus respectivos teores de açúcar.

Fração	mg	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	Proteína	Total
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli				
µg/mg												
PCS-Co		7,7	0	193,6	56,3	32,2	63,7	30,5	383,9	117,2	213,8	714,9
PCI-Co		9,4	0	249,9	50,2	0	33,9	295,5	638,9	91,2	145,3	875,4
Fracionamento da PCI-Co												
CDTA	2,5	0	0	454,2	83,9	0	53,4	57,0	648,5	225,2		
0,01	3,1	5,2	0	158,9	35,3	16,7	13,6	13,2	242,9	103,2		
0,05	0,7											
0,1	0,5											
0,5	4,8	0	0	10,5	0	0	18,8	645,5	674,8	26,0		
1	5,0	0	0	16,4	0	0	28,6	627,8	672,7	19,5		
4	8,4	15,1	0	499,9	93,4	0	30,7	97,2	736,3	172,0		
CEL	1,6											
HNE	2,1											
Total	28,7											
AMR		0	0	104,4	17,9	54,6	54,0	212,7	443,6	17,1	244,0	704,7

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man= manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, HNE=hemiceluloses não extraíveis, CEL=celulose, AMR=amido residual.

Tabela 8: Conteúdo ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões controle e seus respectivos teores de açúcar.

Fração	%	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	Proteína	Total
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli				
µg/mg												
PCI-Te												
PCI-Te	72,4	8,6	0	82,2	143,7	0	15,8	22,0	272,3	167,0	252,8	692,0
PCS-Te												
PCS-Te	5,5	0	0	50,4	20,8	34,8	36,8	21,0	163,9	143,7	184,0	491,6

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man= manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, HNE=hemiceluloses não extraíveis, CEL=celulose

Tabela 9: Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédono de feijões armazenados a 4°C.

Tempo	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	CEL	HNE	Proteína	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	µg/mg					
PCI-Co													
controle	9,4	0	249,9	50,2	0	33,9	295,5	638,9	91,2	56,4	71,9	145,3	1003,7
3½	8,5	0	263,7	49,3	0	25,3	287,2	633,9	89,6	73,1	96,9	102,4	995,9
6½	9,6	0	307,0	59,5	0	33,5	248,7	658,3	127,6	76,9	94,9	105,8	1063,5
11	8,1	0	302,5	52,9	0	26,9	278,4	668,8	104,8	83,1	177,8	153,0	1187,4
24	9,0	0	289,3	53,1	4,7	33,8	387,7	777,6	90,6	42,1	105,8	123,6	1139,7
PCS-Co													
controle	7,7	0	193,6	56,3	32,2	63,7	30,5	383,9	117,2	0	0	213,8	714,9
3½	0	0	246,9	73,2	30,9	74,8	29,0	454,8	117,3	0	0	200,2	772,3
6½	8,6	0	258,2	71,3	37,1	73,3	26,9	475,4	132,6	0	0	230,7	838,7
11	0	9,5	297,8	79,4	35,5	128,1	36,9	587,2	116,6	0	0	171,9	875,7
24	0	0	148,4	30,8	25,6	43,9	21,8	270,5	81,4	0	0	146,3	498,2

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, CEL=celulose, HNE=hemis não extraíveis.

Tabela 10: Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédono de feijões armazenados a TA.

Tempo	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	CEL	HNE	Proteína	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	µg/mg					
PCI-Co													
controle	9,4	0	249,9	50,2	0	33,9	295,5	638,9	91,2	56,4	71,9	145,3	1003,7
8	7,0	0	244,5	47,2	0	47,9	303,2	649,8	115,3	54,8	64,7	121,4	1008,0
24	14,4	4,4	414,1	79,6	0	40,2	121,9	674,6	161,2	77,2	90,5	73,5	1077,0
PCS-Co													
controle	7,7	0	193,6	56,3	32,2	63,7	30,5	383,9	117,2	0	0	213,8	714,9
8	9,6	0	277,0	70,3	39,6	81,0	42,7	520,2	122,9	0	0	195,7	838,8
24	0	0	37,3	4,5	19,3	30,1	8,1	99,3	62,3	0	0	150,5	312,2

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, CEL=celulose, HNE=hemis não extraíveis.

Tabela 11: Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Co) e solúvel (PCS-Co) do cotilédono de feijões armazenados a 37°C.

Tempo	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	CEL	HNE	Proteína	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	µg/mg					
PCI-Co													
controle	9,4	0	249,9	50,2	0	33,9	295,5	638,9	91,2	56,4	71,9	145,3	1003,7
2½	4,1	0	288,3	52,4	0	39,4	309,2	693,4	90,3	52,3	74,9	157,6	1068,4
3½	8,4	0	292,6	53,8	0	40,7	224,5	619,9	119,3	70,9	84,4	125,5	1020,0
6½	9,5	0	407,4	79,0	0	58,3	188,2	742,4	161,3	62,1	95,4	157,6	1218,8
PCS-Co													
controle	7,7	0	193,6	56,3	32,2	63,7	30,5	383,9	117,2	0	0	213,8	714,9
2½	4,1	0	212,9	64,4	49,7	67,4	30,2	428,7	101,0	0	0	260,0	789,6
3½	6,0	0	140,8	36,1	44,1	58,3	32,6	318,1	78,3	0	0	240,5	636,9
6½	2,8	0	127,9	33,5	54,3	65,2	38,2	322,0	71,7	0	0	306,8	700,5

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, CEL=celulose, HNE=hemis não extraíveis.

Tabela 12: Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 4°C.

Tempo	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	A.Totais	Proteína	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	µg/mg				
PCI-Te												
controle	8,6	0	82,2	143,7	0	15,8	22,0	272,3	167,0	439,3	252,8	692,0
3½	0,0	0	105,9	181,5	0	12,6	19,6	319,6	190,2	509,8	263,5	773,3
6½	6,6	0	89,8	153,9	0	12,0	16,8	279,2	232,2	511,4	287,6	799,0
11	7,8	0	116,2	175,1	0	32,3	40,3	371,7	197,0	568,6	211,9	780,6
24	10,5	0	122,9	163,6	0	12,2	15,5	324,8	222,3	547,1	250,1	797,2
PCS-Te												
controle	0	0	50,4	20,8	34,8	36,8	21,0	163,9	143,7	307,6	184,0	491,6
3½	0	0	159,7	56,6	30,4	31,4	9,8	287,8	34,9	322,7	181,8	504,5
6½	9,0	0	162,8	63,4	44,5	38,1	16,1	333,9	170,9	504,8	208,3	713,1
11	0	10,2	178,5	64,9	53,9	62,4	17,9	387,7	203,1	590,8	228,0	818,8
24	2,7	0	103,2	25,8	25,2	17,2	8,0	182,1	138,1	320,3	191,8	512,1

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, CEL = celulose, HNE = hemis não extraíveis, ATotais = açúcares totais.

Tabela 13: Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a TA.

Tempo	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	A.Totais	Proteína	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	µg/mg				
PCI-Te												
controle	8,6	0	82,2	143,7	0	15,8	22,0	272,3	167,0	439,3	252,8	692,0
8	7,9	0	89,6	146,2	0	11,4	14,3	269,4	202,7	472,0	241,0	713,0
24	4,4	0	44,6	101,8	0	4,8	9,4	165,0	261,4	426,4	249,3	675,7
PCS-Te												
controle	0	0	50,4	20,8	34,8	36,8	21,0	163,9	143,7	307,6	184,0	491,6
8	10,0	0	119,8	37,7	46,1	28,1	12,1	253,7	188,9	442,6	233,8	676,4
24	0	0	69,9	21,2	15,9	13,3	5,6	125,9	169,8	295,7	273,8	569,5

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, CEL=celulose, HNE=hemis não extraíveis ATotais = açúcares totais.

Tabela 14: Perfil de açúcares e de proteína da parede celular insolúvel (PCI-Te) e solúvel (PCS-Te) do tegumento de feijões armazenados a 37°C.

Tempo	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	A.Totais	Proteína	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	µg/mg				
PCI-Te												
controle	8,6	0	82,2	143,7	0	15,8	22,0	272,3	167,0	439,3	252,8	692,0
2½	9,3	0	110,8	157,5	0	14,3	19,0	310,8	188,6	499,4	261,1	760,4
3½	6,3	0	102,3	146,3	0	15,0	19,7	289,5	209,1	498,6	295,8	794,4
6½	4,1	0	100,9	158,8	0	13,1	22,9	299,8	220,3	520,2	338,7	858,9
PCS-Te												
controle	0	0	50,4	20,8	34,8	36,8	21,0	163,9	143,7	307,6	184,0	491,6
2½	0	0	88,5	27,0	41,5	30,3	12,5	199,7	86,7	286,4	223,9	510,3
3½	0	0	96,8	41,6	38,6	27,6	11,0	215,7	177,7	393,5	191,8	585,3
6½	10,5	0	137,7	72,4	38,7	38,7	16,6	314,6	214,4	529,0	195,3	724,3

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.N.=soma dos açúcares neutros, A.U.=ácidos urônicos, CEL = celulose, HNE = hemis não extraíveis, A.Totais = açúcares totais.

Tabela 15: Porcentagem de polissacarídeos obtidos no fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijão armazenado a 4°C

Fração	Tempo (meses)				
	controle	3½	6½	11	24
CDTA	8,7	9,4	9,8	6,2	7,3
0,01N	10,6	7,7	8,0	5,3	7,9
0,05N	2,5	2,8	2,8	6,7	4,5
0,1N	1,9	1,0	1,1	2,1	3,0
0,5N	16,8	15,8	14,3	12,1	16,8
1N	17,2	15,7	11,8	13,1	23,3
4N	29,4	30,7	35,1	28,5	22,4
CEL	5,6	7,3	7,7	8,3	4,2
HNE	7,2	9,7	9,5	17,8	10,6

CEL=celulose; HNE=hemiceluloses não extraíveis; 0,01N-4N=frações obtidas nas respectivas normalidades e CDTA=fração obtida pela extração com CDTA

Tabela 16: Porcentagem de polissacarídeos obtidos no fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédone (PCI-Co) de feijão armazenado a TA

Fração	Tempo (meses)		
	controle	8	24
CDTA	8,7	8,1	8,0
0,01N	10,6	9,2	12,9
0,05N	2,5	2,7	4,5
0,1N	1,9	2,4	0,9
0,5N	16,8	16,3	7,2
1N	17,2	19,4	8,9
4N	29,4	29,9	40,8
CEL	5,6	5,5	7,7
HNE	7,2	6,5	9,1

CEL = celulose; HNE = hemiceluloses não extraíveis; 0,01N-4N=frações obtidas nas respectivas normalidades e CDTA= fração obtida pela extração com CDTA

Tabela 17: Porcentagem de polissacarídeos obtidos no fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédono (PCI-Co) de feijão armazenado a 37°C

Fração	Tempo (meses)			
	controle	2½	3½	6½
CDTA	8,7	8,5	9,6	10,5
0,01N	10,6	12,7	13,8	19,0
0,05N	2,5	3,9	2,6	4,8
0,1N	1,9	1,7	1,3	1,8
0,5N	16,8	13,6	12,0	9,5
1N	17,2	17,2	14,5	9,3
4N	29,4	29,7	30,7	29,4
CEL	5,6	5,2	7,1	6,2
HNE	7,2	7,5	8,4	9,5

CEL = celulose; HNE = hemiceluloses não extraíveis;
 0,01N-4N=frações obtidas nas respectivas normalidades
 e CDTA= fração obtida pela extração com CDTA

Tabela 18: Perfil de açúcares neutros e ácidos urônicos nos produtos de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 4°C

Tempo	Açúcares Neutros (μ g/mg)							A.N.	A.U.	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	μg/mg		
CDTA										
controle	0	0	454,2	83,9	0	53,4	57,0	648,5	225,2	873,7
3 ½	13,6	0	433,4	66,5	0	52,2	139,6	705,4	130,6	835,9
6 ½	8,2	0	383,5	65,0	0	49,3	126,2	632,3	151,5	783,8
11	0	0	329,4	50,0	0	52,8	97,1	529,3	157,0	686,3
24	10,3	0	342,4	61,8	0	60,1	102,5	577,0	167,0	744,0
0,01 N										
controle	5,2	0	158,9	35,3	16,7	13,6	13,2	242,9	103,2	346,1
3 ½	0	0	151,0	32,8	14,0	15,4	14,0	227,1	99,0	326,1
6 ½	0	0	157,5	34,6	11,1	17,7	12,2	233,1	108,7	341,8
11	0	0	185,3	45,2	10,0	25,2	19,1	284,7	125,9	410,7
24	0	0	99,6	24,5	12,8	15,4	11,8	164,2	78,2	242,4
0,50 N										
controle	0	0	10,5	0	0	18,8	645,5	674,8	26,0	700,8
3 ½	0	0	14,4	0	0	16,9	683,1	714,4	10,9	725,3
6 ½	0	0	21,2	4,2	0	18,4	737,0	780,7	17,5	798,2
11	0	0	16,9	0	0	16,9	698,6	732,4	20,9	753,3
24	0	0	10,1	0	0	15,2	809,7	834,9	18,6	853,5
1 N										
controle	0	0	16,4	0	0	28,6	627,8	672,7	19,5	692,2
3 ½	0	0	14,4	8,0	0	18,5	663,3	704,3	22,8	727,1
6 ½	0	0	31,1	15,0	0	20,1	655,8	722,1	23,4	745,5
11	0	0	12,9	6,4	0	16,7	629,6	665,5	16,0	681,6
24	0	0	6,6	0	0	14,1	729,2	749,9	12,8	762,8
4 N										
controle	15,1	0	499,9	93,4	0	30,7	97,2	736,3	172,0	908,4
3 ½	17,5	0	476,5	81,7	0	33,7	152,8	762,3	122,5	884,8
6 ½	17,5	0	469,4	77,2	0	33,4	158,0	755,5	167,0	922,5
11	17,3	0	476,3	70,4	0	36,3	111,5	711,8	143,3	855,1
24	16,9	0	518,6	86,1	0	39,3	90,3	751,2	142,1	893,3

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos, A.N.= soma dos açúcares neutros.

Tabela 19: Perfil de açúcares neutros e ácidos urônicos nos produtos de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a TA

Tempo	Açúcares Neutros (μ g/mg)							A.N.	A.U.	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	μg/mg		
CDTA										
controle	0	0	454,2	83,9	0	53,4	57,0	648,5	225,2	873,7
8	0	0	359,5	75,7	0	55,9	82,0	573,1	161,3	734,3
24	9,7	0	610,3	134,2	8,9	87,3	32,8	883,2	165,3	1048,5
0,01 N										
controle	5,2	0	158,9	35,3	16,7	13,6	13,2	242,9	103,2	346,1
8	0	0	211,7	47,6	13,0	22,9	12,8	308,0	119,5	427,6
24	0	0	431,5	78,4	0	35,6	11,3	556,8	157,9	714,6
0,5 N										
controle	0	0	10,5	0	0	18,8	645,5	674,8	26,0	700,8
8	0	0	14,6	0	0	20,9	654,4	689,9	21,5	711,3
24	0	0	74,0	20,5	0	22,2	686,1	802,8	42,9	845,7
1 N										
controle	0	0	16,4	0	0	28,6	627,8	672,7	19,5	692,2
8	0	0	12,9	0	0	19,1	683,3	715,3	19,7	735,0
24	0	0	56,3	19,8	0	17,4	725,4	818,9	28,1	847,0
4 N										
controle	15,1	0	499,9	93,4	0	30,7	97,2	736,3	172,0	908,4
8	14,7	0	460,0	81,6	0	30,9	129,8	717,0	133,1	850,1
24	0	0	688,5	113,7	0	43,2	106,0	951,4	124,6	1076,0

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos, A.N.= soma dos açúcares neutros.

Tabela 20: Perfil de açúcares neutros e ácidos urônicos nos produtos de fracionamento da parede celular insolúvel do cotilédono (PCI-Co) de feijões armazenados a 37°C

Tempo	Açúcares Neutros (µg/mg)							A.N.	A.U.	Total
(meses)	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gli	µg/mg		
CDTA										
controle	0	0	454,2	83,9	0	53,4	57,0	648,5	225,2	873,7
2 ½	6,4	0	460,9	92,2	0	61,4	60,2	681,2	187,5	868,7
3 ½	6,3	0	393,5	82,7	0	58,6	167,0	708,1	134,7	842,9
6 ½	0	0	329,8	91,7	0	59,8	83,2	564,6	189,6	754,3
0,01 N										
controle	5,2	0	158,9	35,3	16,7	13,6	13,2	242,9	103,2	346,1
2 ½	0	0	270,2	48,1	13,3	24,2	10,3	366,2	128,5	494,7
3 ½	1	0	257,0	50,4	13,9	28,3	6,6	357,4	148,5	505,8
6 ½	2,6	0	320,5	66,6	3,0	37,7	8,6	439,1	156,8	595,9
0,50 N										
controle	0	0	10,5	0	0	18,8	645,5	674,8	26,0	700,8
2 ½	0	0	27,5	10,7	0	22,5	819,4	880,1	32,4	912,5
3 ½	0	0	32,8	9,0	0	19,1	662,8	723,6	19,2	742,8
6 ½	0	0	53,7	11,9	0	23,1	734,9	823,5	27,1	850,6
1 N										
controle	0	0	16,4	0	0	28,6	627,8	672,7	19,5	692,2
2 ½	0	0	21,7	3,9	0	17,5	690,3	733,3	19,7	753,0
3 ½	0	0	29,6	12,5	0	20,4	670,7	733,2	20,5	753,7
6 ½	0	0	51,1	17,0	0	21,9	669,0	759,0	23,9	782,9
4 N										
controle	15,1	0	499,9	93,4	0	30,7	97,2	736,3	172,0	908,4
2 ½	19,1	0	606,6	100,4	0	35,2	103,9	865,2	150,0	1015,2
3 ½	21,0	0	599,9	105,3	0	45,6	90,3	862,1	144,8	1006,8
6 ½	17,0	0	535,6	87,8	0	37,6	116,8	794,9	125,8	920,7

Ram=ramnose, Fuc=fucose, Ara=arabinose, Xil=xilose, Man=manose, Gal=galactose, Gli=glicose, A.U.=ácidos urônicos, A.N.= soma dos açúcares neutros.