

ANA CRISTINA NASCIMENTO CHIARADIA

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE PIGMENTOS DE FEIJÃO E
ESTUDO DA SUA AÇÃO NA QUALIDADE PROTÉICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
JUNHO - 1997

ANA CRISTINA NASCIMENTO CHIARADIA

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE PIGMENTOS DE FEIJÃO E
ESTUDO DA SUA AÇÃO NA QUALIDADE PROTÉICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 11 de abril de 1997

Prof. Paulo César Stringheta
(Conselheiro)

Prof. Dilson Teixeira Coelho
(Conselheiro)

Profa. Neuza Maria Brunoro Costa

Profa. June Ferreira Maia Parreiras

Prof. José Carlos Gomes
(Orientador)

Aos meus pais Luiz Américo e Nicea.

Às minhas irmãs Ana Lúcia e Mariana.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, à CAPES e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste curso.

À Nacional Comércio e Empreendimentos Ltda., pelo apoio e pela confiança.

Ao orientador Prof. José Carlos Gomes, por acreditar em minha capacidade e pela orientação.

Ao conselheiro Prof. Paulo César Stringheta e à Profa. Neuza Maria Brunoro Costa, pelas sugestões, pelos esclarecimentos e pelas correções apresentadas.

Ao conselheiro Prof. Dilson Teixeira Coelho, pelas correções e pelas sugestões apresentadas.

À Profa. June F. Maia Parreiras, pela amizade e pelas sugestões apresentadas.

Aos Profs. Luiz Cláudio Barbosa e Sebastião C. C. Brandão, pela disponibilidade e pela colaboração.

Aos demais professores do curso de pós-graduação do DTA/UFV, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da UFV, pelo apoio e pelo auxílio, em especial às Sras. Lígia e Zezinha, ao Valério e ao Ricardo.

Aos estudantes de graduação Erlon e Érica, pelo auxílio.

Aos amigos, em especial a Cíntia, Lucy, Ana Cláudia e Luciana, pelo convívio e pela amizade. Ao Beto, pela colaboração.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANA CRISTINA NASCIMENTO CHIARADIA, filha de Luiz Américo Chiaradia e Nicéa Nascimento Chiaradia, nasceu em Belo Horizonte, em 10 de outubro de 1964.

Em 1985, graduou-se em Farmácia, pela UFMG.

Em 1986, também na UFMG, concluiu, em nível de especialização, o curso de Farmácia Industrial.

Em 1990, concluiu o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

Trabalhou nas indústrias Rhodia Farma (Santo André-SP), Itambé (Belo Horizonte-MG) e Nacional Comércio e Empreendimentos Ltda. (Contagem-MG).

Em março de 1994, iniciou o curso de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

EXTRATO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Antocianinas	3
2.1.1. Extração de antocianinas	3
2.1.2. Estrutura química das antocianinas	5
2.1.3. Purificação das antocianinas	10
2.1.4. Efeito antioxidante	13
2.1.5. Efeito anticarcinogênico	14
2.1.6. Ação antioxidante de antocianinas	15
2.2. Conteúdo protéico do feijão	16
2.3. Fatores antinutricionais presentes no feijão	21
2.3.1. Polifenóis	23
2.3.1.1. Taninos	25
2.3.1.2. Flavonóides	32

2.3.2. Lectinas (fito-hemaglutininas)	34
2.3.3. Inibidores de tripsina	36
2.3.4. Fitatos	38
2.3.5. Inibidores de α -amilase	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Identificação das antocianinas presentes no feijão	42
3.1.1. Escolha do solvente extrator	42
3.1.2. Preparação do extrato	43
3.1.3. Condições para separação das frações de antocianinas	43
3.1.4. Cromatografia em papel	44
3.1.5. Purificação das frações	44
3.1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	44
3.1.6.1. Preparação das amostras e dos reagentes	44
3.1.6.2. Análise por HPLC	46
3.1.7. Reações específicas de antocianinas	46
3.1.8. Hidrólise ácida das frações purificadas	47
3.1.8.1. Identificação das antocianidinas	47
3.1.8.2. Identificação dos açúcares	47
3.1.9. Hidrólise ácida controlada	48
3.1.10. Preparo da solução de delphinidina de berinjela	48
3.1.11. Ressonância magnética nuclear (RMN)	49
3.2. Avaliação da qualidade protéica do feijão	49
3.2.1. Efeito de retirada do tegumento na qualidade protéica	49
3.2.1.1. Preparo das dietas	49
3.2.1.2. Ensaio biológico	50

3.2.1.3. Análise dos resultados	52
3.2.2. Efeito da extração de pigmentos na qualidade protéica	52
3.2.2.1. Preparo das dietas	52
3.2.2.2. Ensaio biológico	53
3.2.2.3. Análise dos resultados	54
3.2.3. Análise de polifenóis	55
4. RESULTADOS	56
4.1. Escolha do solvente extrator	56
4.2. Escolha da fase móvel para purificação do extrato	57
4.3. Purificação das frações de antocianinas	57
4.4. Identificação da estrutura dos pigmentos purificados	62
4.5. Efeito da retirada do tegumento na qualidade protéica	73
4.6. Efeito da extração de pigmentos na qualidade protéica	81
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

EXTRATO

CHIARADIA, Ana Cristina Nascimento, D.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 1997. **Determinação da estrutura de pigmentos de feijão e estudo da sua ação na qualidade protéica.** Professor Orientador: José Carlos Gomes. Professores Conselheiros: Paulo César Stringheta e Dilson Teixeira Coelho.

Objetivou-se com este trabalho identificar as estruturas químicas dos pigmentos presentes no feijão-preto adquirido na região de Viçosa. Etanol 70% acidificado com 0,5% de HCl foi utilizado como solvente extrator. Após a obtenção do extrato bruto, foram testadas diversas fases móveis para cromatografia descendente em papel. BFW (n-butanol - ácido fórmico - água) na proporção 15:2,5:2,4 apresentou os melhores resultados e possibilitou a separação das seis frações de antocianinas presentes. Através de reações químicas específicas e métodos espectrofotométricos e cromatográficos identificaram-se as três principais frações isoladas. São elas: delfinidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e malvidina 3-glicosídeo. Avaliou-se, através de ensaios biológicos, o efeito da retirada do tegumento e das antocianinas e de outros polifenóis na qualidade das proteínas do feijão. Foram analisados PER, NPR, NPU e digestibilidade. Os resultados obtidos mostram que a retirada do tegumento do

feijão cozido reduz seu valor protéico, provavelmente pela eliminação simultânea de aminoácidos sulfurados e lisina provenientes de proteínas presentes nessa parte dos grãos. A extração de pigmentos de feijão não provocou o aumento da qualidade protéica, como se esperava. Esse resultado se deve, provavelmente, à migração de polifenóis dos tegumentos para os cotilédones durante o processo de extração desses compostos. Esta migração proporciona a interação destes polifenóis com proteínas, tornando-as indisponíveis.

ABSTRACT

CHIARADIA, Ana Cristina Nascimento, D.S., Universidade Federal de Viçosa, June 1997. **Determination of the structure of bean pigments and study of its action in proteic quality.** Advisor: José Carlos Gomes. Committee members: Paulo César Stringheta and Dilson Teixeira Coelho.

The objective of this work was to identify the chemical structures of black bean pigments from Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The extraction solvent was an aqueous solution of ethanol 70% acidified with 0,5% HCl. After the acquisition of crude extract, several mobile phases for descendent paper chromatography were tested. Best results were obtained with BFW (butanol-formic acid-water) 15:2,5:2,4, which allowed the isolation of six anthocyanins fractions could be separated. Through specific chemical reactions and spectrophotometric and chromatographic methods, the three main fractions were identified: delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside and malvidin 3-glucoside. The effect of removal of tegument, anthocyanins and other polyphenols from beans in the protein quality were evaluated by biological assays. PER, NPR, NPU and digestibility were determined. The results indicated that removal of tegument of cooked bean, reduced its protein value, probably due to simultaneous elimination of sulfur aminoacids and lysine from proteins present in the tegument. The extraction of anthocyanins did not increase the protein

quality of beans as expected. Possibly, this result was due to the migration of polyphenols from bean tegument to cotyledons during the extraction process, where polyphenols may interact with proteins making them not available.

1. INTRODUÇÃO

As antocianinas são pigmentos naturais bastante conhecidos, pois determinam a coloração característica de uma grande variedade de vegetais, incluindo aqueles usados na alimentação humana, podendo ser citado o exemplo do feijão (*Phaseolus vulgaris*).

O feijão é a leguminosa mais consumida na América Latina, fornecendo quantidades significativas de proteínas e calorias, dentre outros nutrientes (COELHO, 1991).

A identificação dos constituintes de um alimento tão consumido é de suma importância para o esclarecimento de seu real valor nutritivo.

Em razão do teor elevado de proteínas nos seus grãos e da composição aminoacídica complementar à das proteínas dos cereais, essa leguminosa contribui para melhoria do valor protéico das dietas de grande número de indivíduos, especialmente nos países latino-americanos, onde dietas compostas predominantemente de leguminosas e cereais constituem a base da alimentação diária (KAKADE e EVANS, 1965; LIENER, 1979).

Entretanto, suas proteínas apresentam algumas limitações quanto à qualidade, pelo fato de serem deficientes em aminoácidos sulfurados, triptofano e por conter fatores antinutricionais que interferem no desempenho protéico

nutricional, seja na digestibilidade ou na absorção (LIENER, 1979; SÃO JOSÉ et al., 1986).

Dentre os fatores antinutricionais presentes nas leguminosas, os que têm maior interesse são os polifenóis, as lectinas e os inibidores de tripsina. O papel destes fatores antinutricionais sobre o desempenho nutricional das leguminosas poderia ser explicado pela formação de complexos entre os polifenóis e as proteínas, os quais são insolúveis e de baixa digestibilidade por monogástricos, podendo modificar a estrutura do epitélio intestinal, levando à inibição irreversível e, dessa forma, diminuindo a capacidade absorptiva do organismo (BLANCO e BRESSANI, 1991; VILLANHUEVA, 1987). Estudos indicam que os polifenóis são, dentre os fatores antinutricionais, os que mais contribuem para a baixa digestibilidade do feijão (BRESSANI e ELIAS, 1984; BRESSANI et al., 1991).

A maior concentração de polifenóis é encontrada em cascas de sementes coloridas e a menor, na casca de sementes brancas ou em outra parte anatômica da semente (BRESSANI et al., 1991).

A digestibilidade das proteínas decresce com o aumento da pigmentação do tegumento da semente. Os pigmentos são, geralmente, compostos fenólicos, que podem interagir com as proteínas do feijão, decrescendo a sua digestibilidade e utilização (BRESSANI et al., 1991).

A elucidação da real participação dos polifenóis na qualidade protéica do feijão, bem como o estudo das possíveis ações desses compostos contra doenças crônico-degenerativas, é de grande importância, visto que trabalhos recentes têm apontado os benefícios destes compostos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Antocianinas

2.1.1. Extração das antocianinas

Existe, na literatura, descrição de vários processos e solventes utilizados para a extração de pigmentos de vegetais. A extração de antocianinas é necessariamente o primeiro passo para a determinação total e individual de antocianinas em qualquer tecido de planta (FULEKI e FRANCIS, 1968). Estes autores afirmam que o melhor método de extração será aquele em que uma quantidade de interferentes, bem como a perda de antocianinas devido a mudanças enzimáticas e não-enzimáticas, seja mínima.

Segundo STRACK e WRAY (1989), a extração de antocianinas é comumente acompanhada pela maceração da parte vegetal com metanol ou etanol acidificado com HCl (0,1 a 1,0%). Em certos casos, dependendo da parte da planta, esses autores aconselham a adição de água (10 a 50%) para se conseguir uma completa extração.

JURD (1964) propôs extrair antocianinas de tecidos de plantas utilizando SO₂ como solvente extrator. Segundo este autor, apenas 50 ppm seria suficiente para manter estáveis as antocianinas, bastando manter o pH do meio em valores próximos a 1. Palamidis e Markakis (1975), citados por MARKAKIS (1982),

relataram que a solução aquosa de SO₂ a 500ppm foi mais eficaz que a água para a extração de antocianinas de casca de uva e que a antocianina extraída com solução de SO₂ foi mais estável como corante em uma bebida carbonatada. Trabalhando na extração de antocianinas a partir de cascas de uva (*Vitis vinifera* L.; cv. Cabernet), através do método do diferencial de pH, DONDERO e BADILLA (1983) utilizaram três solventes extratores: água, água com 500ppm de SO₂ e etanol 95% com 0,01% (p/v) de ácido cítrico, encontrando como melhor solvente, após seis extrações, o etanol 95% com 0,01% de ácido cítrico, obtendo-se 356,90 mg/100g, seguido da água com 247,37 mg/100g e da água com 500ppm de SO₂, com 243,11 mg/100g de casca. Ahmed et al. (1977), citados por MARKAKIS (1982), comprovaram a eficiência de extração entre SO₂ a 350ppm e metanol acidificado, em repolho vermelho, sendo o metanol acidificado o melhor extrator.

Utilizando metanol como solvente em HCl 0,1%, LU et al. (1992) extraíram antocianinas de flores vermelho-arroxeadas de *Pharbitis nil* e MORI e SAKURAI (1994) extraíram antocianinas do morango. Já STRINGHETA (1991) extraiu antocianina de *Panicum mellinis* utilizando metanol acidificado com HCl a 0,05% e FORNI et al. (1993) também utilizaram metanol, mas acidificado com HCl 1,0%, para extração de antocianinas em amoras (*Prunus avium*). Por outro lado, GUEDES (1993) utilizou metanol acidulado com ácido cítrico a 0,5% para extração em berinjela, amora e morango, mostrando ser um solvente muito eficiente, com a vantagem adicional de o ácido cítrico não hidrolisar as ligações glicosídicas.

DRAETTA et al. (1985) extraíram, a frio, com metanol contendo 1% de ácido clorídrico, pigmentos de ameixa (*Prunus salicina*, L.) e determinaram o conteúdo total de antocianinas com base nos valores de absorbância em diferentes valores de pH (pH 1,0 e pH 4,5), encontrando um teor de 29,5 mg de antocianinas por 100g de fruto, expresso em termos de cianidina-3-glicosídeo.

SHI et al. (1992) extraíram antocianinas a partir de folhas de *Tradescantia pallida*, usando água gaseificada com HCl 0,1%. SAITO e

HARBORNE (1992) utilizaram uma solução de metanol, ácido acético e água na proporção de 10:1:9, para a extração de antocianinas a partir de pétalas frescas de *Labiateae*.

Utilizando-se o etanol 95% como solvente extrator, FULEKI e FRANCIS (1968) extraíram antocianinas de “cranberries” (*Empetrum nigrum* coll.) acidificando com HCl 0,1N (85:15) e HCl 1,5N. KARPA et al. (1984) e HANSEN et al. (1985) extraíram antocianinas de “cranberry” e “eldeberry” (*Sambucus nigra* L.), respectivamente, seguindo o mesmo método de FULEKI e FRANCIS (1968). BLOM e THOMASSEM (1985) realizaram a extração utilizando etanol a 96% em HCl 0,1N, enquanto TERAHARA et al. (1986) trabalharam com etanol : ácido acético : água (10:1:10), para a extração de antocianinas de *Dianthus caryophyllus* e *D. deltoides*. OSZMIANSKI e SAPIS (1988) utilizaram etanol 80% em HCl 0,1% para frutos de “chokeberry” (*Aronia melanocarpa*) e LIAO et al. (1992) utilizaram etanol e água para uvas vermelhas.

A literatura cita diversas fontes de antocianinas e sua quantificação.

O Quadro 1, adaptado de Kuhnau (1976), citado por TIMBERLAKE (1988), mostra um resumo das principais fontes de antocianinas e teor de pigmento, pesquisados até aquele ano.

2.1.2. Estrutura química das antocianinas

As antocianinas estão incluídas no grupo de pigmentos de ocorrência natural, responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de muitas espécies do reino vegetal. As antocianinas, substâncias fenólicas, são glicosídeos de antocianidinas, polihidroxi derivados do íon flavilium (Figura 1). As antocianidinas (agliconas) são substâncias polihidroxiladas aparentemente ausentes nos tecidos de plantas (Jackman, 1987a, citado por STRINGHETA, 1991).

A presença de antocianidina na sua forma livre em tecidos de plantas já foi relatada; porém, é bastante improvável devido a sua alta insolubilidade e instabilidade. Tais resultados são devidos, provavelmente, à hidrólise, que pode

Quadro 1 - Principais fontes de antocianinas e teor de pigmento (mg/100g), segundo Kuhnau (1976), citado por TIMBERLAKE (1988)

FONTES (produto)	TEOR DE ANTOCIANINAS (mg/100g)
“Cranberry”	60 a 200
“Blueberry” (amora roxa)	130 a 250
“Cherry” (Framboesa)	45
“Cowberry”	100
“Black currant”	130 a 400
“Red grape” (uva vermelha)	65 a 140
“Plum” (ameixa)	2 a 25
“Red raspberry” (amora vermelha)	300 a 400
“Strawberry” (morango)	30 a 35
“Red cabbage” (repolho vermelho)	25
“Red onion” (cebola vermelha)	25
“Rhubarb” (ruibarbo)	100
“Beans” (feijões)	1 a 1000

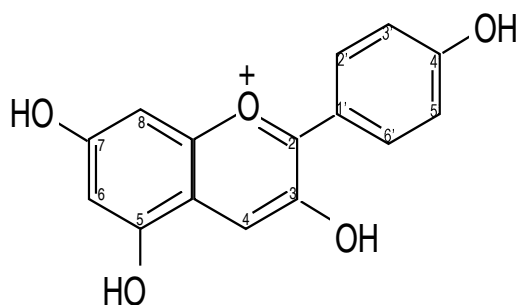


Figura 1 - Estrutura básica das antocianinas (HARBORNE, 1967).

ocorrer durante extração e isolamento. Por serem usados, com tais objetivos, solventes contendo ácido, é praticamente impossível evitar a ocorrência de hidrólise durante esses procedimentos. Correndo cromatogramas após poucos minutos da extração com metanol frio contendo 0,1% de HCl concentrado, a hidrólise pode ser minimizada (HARBORNE, 1967).

Um reexame de flores onde havia sido relatada a presença de antocianidinas livres mostrou que apenas antocianinas estavam presentes (HARBORNE, 1967).

Segundo GEISSMAN (1962), as antocianinas são caracterizadas estruturalmente por possuírem esqueleto de carbono C6-C3-C6, e, em função disto, podem estar associadas com compostos flavonóides não-antociânicos. Por outro lado, Brouillard, 1982, e Griseback, 1982, citados por STRINGHETA (1991), afirmam que, apesar de possuírem a mesma origem biossintética de outros flavonóides naturais, as antocianinas diferem destes por absorverem fortemente na região visível do espectro.

As antocianinas são glicosídeos das antocianidinas, cujo núcleo básico é a estrutura do íon 4'-hidroxiflavilium. Todas as antocianinas são compostas de duas ou três partes: a estrutura básica, que é uma aglicona (antocianidina); um ou mais açúcares; e, freqüentemente, um ou mais grupos acil (GUIMARÃES, 1987; FRANCIS, 1992).

De acordo com HARBORNE (1967) e FRANCIS (1989), podem-se relacionar as antocianidinas que ocorrem nas antocianinas naturais conforme mostra o Quadro 2, sendo as que ocorrem com maior freqüência, segundo FRANCIS (1977) e BOBBIO e BOBBIO (1992), pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, malvidina e peonidina.

Os grupos metoxila e hidroxila, além da presença do açúcar e ácido, têm efeito importante na cor e na estabilidade das antocianinas. A mesma antocianina poderá ter diferentes cores, dependendo do pH, da concentração da solução e da presença de copigmentos, entre outros fatores. Com o aumento do número de hidroxilas, a coloração das antocianinas muda de rosa para azul. A presença de

Quadro 2 - Antocianidinas que ocorrem nas antocianinas naturais (adaptado de HARBORNE (1967) e FRANCIS (1989))

Antocianidinas	Posição de Substituição						
	3	5	6	7	3'	4'	5'
Apigenidina (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H
Luteolidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H
Triacetidina (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Aurantidina (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Rosinidina (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Pulchelidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH
Europinidina (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
Hirsutidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe
Capensinidina (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe

grupo metoxila no lugar da hidroxila reverte a tendência anterior (MAZZA e BROUILLARD, 1987b).

A diferença de cor entre as antocianinas, que são vermelhas, e as desoxiantocianidinas, que são amarelas, está na presença do grupo hidroxila na posição C-3 das antocianinas. A mesma hidroxila desestabiliza a molécula, uma vez que as 3-desoxiantocianidinas são mais aceitáveis que as antocianinas correspondentes (SWENEY e IACOBUCCI, 1983).

Antocianinas glicosiladas em C-3 a um dado pH possuem coloração mais intensa que as antocianinas glicosiladas em C-3 e C-5 e glicosiladas em C-5. Comparando o comportamento do espectro, HARBORNE (1967) e TIMBERLAKE e BRIDLE (1977) mostram que 3, 5 di e 5- glicosídeo têm somente cerca de 50% de absorção a 440 nm da antocianina 3-glicosídeo e de outras antocianinas livres.

A natureza dos açúcares, ácidos e números de grupos metoxila tem pouco efeito nas reações que induzem modificações estruturais, mas a presença e a posição de suas ligações na molécula podem influenciar profundamente as alterações estruturais (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1980). Segundo ASEN (1976), essas modificações são geralmente obscuras, muito embora sejam consideradas como as principais responsáveis pelas mudanças de coloração associadas às antocianinas.

As antocianinas podem ser glicosiladas por diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7, mas sempre ocorre a glicosilação na posição C-3 (HARBORNE, 1958a). Glucose, arabinose, galactose e raminose são os açúcares mais comuns ligados às antocianidinas. Di e trissacarídeos podem também glicosilar algumas antocianidinas (HARBORNE, 1967; TIMBERLAKE e BRIDLE, 1975).

Muitos são os casos em que ácidos orgânicos estão acilando os resíduos de açúcares, sendo os mais comuns o cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, sinápico, malônico e acético, entre outros (FRANCIS, 1992).

As antocianidinas são instáveis e menos solúveis em solução aquosa que as antocianinas (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1966), e a glicosilação aumenta a

estabilidade e torna a molécula de pigmento solúvel em água (HARBORNE, 1979). A perda do açúcar ligado na posição C-3 é acompanhada de uma rápida decomposição da aglicona, com alteração irreversível na coloração da solução (JURD, 1972).

Antocianidinas são obtidas de antocianinas puras através de hidrólise ácida (HCl 2N a 100°C por 40 min ou HCl 6N por períodos menores) (HARBORNE, 1967).

A glicosilação em C-5 também é freqüentemente encontrada nas antocianinas (BROUILLARD, 1982). Cada substituição está associada a um deslocamento batocrômico, tal que a diferença no comprimento de onda de máxima absorção da antocianina 3-glicosídeo em relação à antocianidina 3,5-diglicosídeo tem sido utilizada como meio de sua diferenciação por técnicas espectrais (HARBORNE, 1958b).

É freqüente a glicosilação na posição 7 e raramente nas posições 3', 4' e, ou, 5', pois impedimentos estéricos geralmente dificultam a glicosilação nestas posições (BROUILLARD, 1982). O mesmo autor afirma que nenhuma antocianina apresenta a glicosilação nos grupos hidroxílicos nas posições 5, 7 e 4' ao mesmo tempo, pois um dos grupos hidroxila deve permanecer livre em uma destas posições, já que é essencial para a formação de uma estrutura quinoidal, também chamada de anidrobases. A estrutura quinoidal das antocianinas é responsável pela pigmentação de flores e de tecidos de frutas (JURD e ASEN, 1966; ASEN et al., 1970, 1972, 1975; SCHEFFELDT e HRAZDINA, 1978; WILLIAMS e HRAZDINA, 1979).

Os flavonóides antociânicos absorvem fortemente na região do visível, apresentando mais forte coloração, enquanto os flavonóides não-antociânicos absorvem na região compreendida entre 350 e 380 nm (BROUILLARD, 1982).

2.1.3. Purificação das antocianinas

HARBORNE (1958a) purificou antocianinas utilizando a técnica de cromatografia em papel, o que foi seguido por Francis et al., 1966, e Francis, 1967, citados por JACKMAN et al. (1987).

A relação entre a estrutura e a mobilidade cromatográfica, em cromatografia em papel de várias antocianinas, foi estudada por HARBORNE (1967). Este autor cita que a mobilidade decresce regularmente com o aumento da hidroxilação, mas aumenta com a metilação. Relações similares são encontradas nas séries de 3-deoxy-antocianidinas. O valor de Rf é o mais importante e “reprodutível”.

SAKELLARIADES e LUH (1974) purificaram extratos de uvas através de cromatografia bidimensional em papel. Esta escolha foi feita após o Forestal (água:ácido acético:ácido clorídrico; 10:30:3) sozinho não ter conseguido separar as seis bandas contidas no extrato. Assim, eles empregaram, na primeira direção, Forestal e, na segunda, BUHCl (n-butanol:HCl 2N, 1:1), conseguindo ótima resolução na separação das seguintes antocianinas: delfinidina, petunidina, cianidina, malvidina e peonidina. TIMBERLAKE e BRIDLE (1977) utilizaram cromatografia ascendente em papel bidimensional, com papel Whatman nº 2 em BAW (14:1:5), seguido de HOAC 2% e HOAC-HCl (15:13:82), para purificarem extrato de morango.

BOBBIO et al. (1983) purificaram o extrato de *Cyphomandra betaceae* através da cromatografia em camada delgada, em placas de celulose, com os seguintes solventes: BAW (6:1:2), HCl 1% (HCl concentrado:água, 3:97), Forestal (30:3:10) e AWH (15:82:3). ANDERSEN e FRANCIS (1985), usando cromatografia em placa de celulose, em ácido clorídrico - ácido fórmico - água (24,5:23,7:51,4), mostraram ser ele muito eficiente na separação de antocianidinas mono, di e triglicosiladas.

Cromatografia em papel Whatman nº 3 MM foi utilizada por DRAETTA et al. (1985) para purificar extrato de ameixa em HCl 1%, BAW (4:1:5) e BFW (100:25:6).

Estudando extrato de berinjela, amora e morango, GUEDES (1993) utilizou a filtração por osmose reversa em papel Millipore com cartucho de *cut off* 400, pressão de 180 psi, conseguindo concentrar os extratos a volumes pequenos e teor de sólidos desejáveis. Essa filtração atuou, ainda, como uma

purificação preliminar, eliminando alguns açúcares livres, vitaminas, ácidos orgânicos e alguns flavonóides que estavam atuando como interferentes. Posteriormente, esse autor utilizou cromatografia descendente em papel, desenvolvida em HCl 1,0%, BAW (6:1:2) e HAC 10%, obtendo uma boa resolução entre suas bandas, completando, assim, o processo de purificação.

ZULU et al. (1994) utilizaram cromatografia em papel para separar e purificar compostos flavonóides da raiz de duas espécies de *Rhynchosia*, utilizada na preparação da bebida Zambian. Utilizaram como sistemas eluentes o BAW (4:1:5) por cerca de 16 a 24 horas e, posteriormente, em ácido acético aquoso a 15%, por sete horas. A purificação de cada fração foi comprovada por meio de cromatografia bidimensional usando, na primeira direção, BAW e, na segunda, ácido acético aquoso a 15% e, também, utilizando HPLC com coluna C-18, detector UV-VIS a 270nm e, como eluente, metanol : água : ácido acético (30:65:5).

A separação de cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo, em suspensão de cultura de células de morango, foi realizada por MORI e SAKURAI (1994) utilizando HPLC em uma coluna de ODS, eluída com 35% de ácido acético - acetonitrila - água (20:25:55), diluída com água contendo 0,1% de TFA e solução de metanol composta de água - ácido acético - metanol (80:15:5), contendo, também, 0,1% de TFA a 40°C. BAKKER et al. (1994) utilizaram a HPLC com detector de iodo, fase reversa, em coluna de ODS, para confirmar a presença de diferentes antocianinas em sucos de 39 genótipos de morango.

O método de cromatografia descendente em papel Whatman nº 3MM, desenvolvido em butanol:ácido fórmico:água (BFW; 100:25:60) e ácido acético : água (HAC) a 15%, foi utilizado por FULEKI (1971) para purificação de pigmento de *Allium cepa*, obtendo oito frações de antocianidina.

Antocianidinas podem ser separadas com sucesso por cromatografia de camada fina em sílica-gel, mas a reprodutibilidade dos valores de Rf não é comparável com os resultados obtidos com cromatografia em papel (HARBORNE, 1967).

Antocianidinas, assim como outros fenóis, mudam de cor, em papel, quando amônia é aplicada. Uma coloração azul momentânea pode ser notada (HARBORNE, 1967).

Antocianidinas fluorescem em papel somente se o anel B tem um único grupo p-hidroxil e o 5-hidroxil é metilado ou glicosilado (HARBORNE, 1967).

O único cuidado que deve ser tomado é evitar solventes contendo ácido mineral durante estágios finais da purificação. O ácido reage com substâncias do papel, produzindo arabinose, que pode causar erro nos resultados quando os açúcares das antocianinas são analisados. Misturas de solventes contendo ácido acético podem ser usadas satisfatoriamente e são melhores quando usadas em papéis previamente lavados com ácido acético diluído (HARBORNE, 1967).

No caso de glicosídeos simples, o aumento de açúcares presentes provoca diminuição no valor de Rf em butanol-ácido acético e aumento em ácido-água (HARBORNE, 1967).

2.1.4. Efeito antioxidante

As antocianinas têm sido muito usadas ao longo do tempo na alimentação humana, aparentemente sem causar danos (MAZZA e BROUILARD, 1987a). Existem evidências indicando que as antocianinas, além de não serem tóxicas ou mutagênicas, apresentam propriedades terapêuticas benéficas, particularmente em oftalmologia e para o tratamento de vários problemas na circulação sangüínea (TIMBERLAKE, 1988). Esse autor acredita que, tanto quanto para o aumento do uso das antocianinas como corantes de alimentos, sua aplicação na medicina também aumenta à medida que seu mecanismo fisiológico de ação torna-se mais compreendido. Por exemplo, antocianinas de amora roxa têm sido aplicadas para o tratamento de feridas, úlceras duodenais e estomacais, inflamação de boca e garganta, doenças vasculares e doenças relacionadas com o metabolismo de lipídios e glicerídeos. De acordo com TIMBERLAKE (1988), existem patentes de preparações farmacêuticas que contêm sais de flavilium, e, mais recentemente, as

antocianinas têm sido usadas para o tratamento de doenças de circulação sanguínea.

2.1.5. Efeito anticarcinogênico

A dieta ocidental consistindo de uma alta proporção de carne e de uma proporção relativamente baixa de vegetais aparece como a responsável pela alta taxa de ocorrência de câncer de mama, colon e próstata (TROLL et al., 1994).

Substâncias quimiopreventivas do câncer são agentes estruturalmente diversos que interferem em um ou mais estágios da carcinogênese. Elas podem suprimir a ativação de carcinógenos ou a promoção e o progresso do câncer, muitas vezes pela supressão da formação do ânion superóxido radical (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pelos neutrófilos humanos ativados, que são promotores de tumores. Esta inibição da geração de H_2O_2 pode ser considerada um sistema útil para identificação e quantificação da atividade de agentes preventivos do câncer. Estes agentes inibem inflamação e danos oxidativos ao DNA, como também inibem a promoção de tumores (TROLL et al., 1994).

Espécies de oxigênio como os radicais hidroxil, ânion radical superóxido e oxigênio *singlet* são consideradas agentes que atacam ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares e elevam a peroxidação lipídica. Esta peroxidação está fortemente associada com o envelhecimento e a carcinogênese (TSUDA et al., 1994b).

Sistemas vitais são protegidos contra espécies de oxigênio ativo por enzimas, como a superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase; eles também recebem proteção não-enzimática por antioxidantes exógenos, como o α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno e ácido úrico (TSUDA et al., 1994b).

A formação de bases de DNA oxidadas por espécies de oxigênio ativo é qualitativamente semelhante aos danos causados por radiação ionizante, que pode agir como um iniciador ou como promotor em processos carcinogênicos. A formação de bases de DNA oxidadas pode levar a mutações, uma característica de iniciação de câncer por oxidantes e outros carcinógenos. Assim, prevenindo a formação dessas bases de DNA oxidadas, pode-se bloquear o processo de produção de tumores (TROLL et al., 1994).

2.1.6. Ação antioxidante de antocianinas

As antocianinas parecem desempenhar um papel importante como antioxidantes da dieta, atuando na prevenção de peroxidação lipídica de membranas celulares, induzidas por radicais oxigênio ativos em sistemas vivos (TSUDA et al., 1994a).

Kakegawa et al., 1987, citados por TSUDA et al. (1994b), relataram que a síntese da antocianina [cianidina 3-(6''-malonil) glicosídeo] foi induzida por iluminação com luz UV em culturas de células de *Centaurea cyanus*. Takahashi et al., 1991, também citados por TSUDA et al. (1994b), relataram que as células que acumulavam a antocianina [cianidina 3-(6''-malonil) glicosídeo] eram mais resistentes à irradiação com luz UV, reduzindo a formação de dímeros pirimidina induzidos pela luz UV. Esses resultados indicam que as antocianinas desempenham uma importante função na proteção de células de plantas contra os danos induzidos pela UV e também sugerem que os pigmentos podem funcionar como antioxidantes, para proteger os danos oxidativos em células animais.

Um extrato preparado do tegumento de grão de feijão-ervilha (*Phaseolus vulgaris* L.) vermelho e preto exibiu forte atividade antioxidativa. Para determinar o papel antioxidativo dos pigmentos nos tegumentos dos grãos, os pigmentos cianidina 3-O-β-D-glicosídeo e pelargonidina 3-O-β-D-glicosídeo (de feijão-vermelho) e delphinidina 3-O-β-D-glicosídeo (de feijão-preto) foram isolados. Cianidina 3-O-β-D-glicosídeo mostrou forte atividade antioxidativa no sistema de ácido linoléico em pH 7,0, enquanto pelargonidina 3-O-β-D-glicosídeo e delphinidina 3-O-β-D-glicosídeo não mostraram atividade antioxidativa neste pH. Em condições ácidas (pH 3,0 e 5,0), pelargonidina 3-O-β-D-glicosídeo e delphinidina 3-O-β-D-glicosídeo mostraram forte atividade antioxidativa. Esses resultados sugerem que o mecanismo antioxidativo de cianidina 3-O-β-D-glicosídeo pode ser diferente daquele de pelargonidina 3-O-β-D-glicosídeo e delphinidina 3-O-β-D-glicosídeo (TSUDA et al., 1994a).

Também os efeitos de extratos brutos de casca de feijões *navy* (*P. vulgaris* L.) na estabilidade oxidativa de óleo comestível foram relatados por

Onyeneho e Hettiarachchy, 1991, citados por TSUDA et al., (1994a); porém, estudos químicos detalhados dos antioxidantes de feijão são desconhecidos.

Cianidina 3-O- β -D-glicosídeo (purificada da casca de feijões) e cianidina comercial apresentaram atividade antioxidativa nos seguintes sistemas: auto-oxidação do ácido linoléico, lipossomas, membrana de eritrócito de coelho e sistemas microssomais do fígado de ratos. No sistema microssomal de fígado de rato, estas antocianinas exibiram atividade antioxidante mais forte do que α -tocoferol. Esses dados sugerem que os pigmentos podem desempenhar um papel importante na prevenção de peroxidação lipídica de membranas celulares induzida por radicais oxigênio ativados em sistemas vivos (TSUDA et al., 1994b).

2.2. Conteúdo protéico do feijão

Uma característica marcante das sementes de leguminosas é o seu alto conteúdo protéico. A porcentagem de proteínas em feijão varia entre 16 e 33%, para vários tipos de feijão analisados (OSBORN et al., 1988).

Há evidências de que fatores ambientais como localização geográfica e estação do ano podem influenciar significativamente o conteúdo protéico de feijões (SATHE et al., 1984).

O conteúdo de proteína nas diversas variedades de feijão se encontra localizado, principalmente, nos cotilédones, com pequenas quantidades presentes na casca (ELIAS et al., 1979). Essas proteínas são classificadas em albuminas, globulinas, prolaminas e glutaminas, com base na solubilidade. Cada fração possui uma composição aminoacídica característica, e a qualidade nutricional das proteínas totais do grão é dependente da proporção relativa de cada uma delas (JOHNSON e LAT, 1974).

Assim como em grande parte das proteínas de leguminosas, a maioria das proteínas de feijão são globulinas. Estas são caracterizadas por serem solúveis em soluções salinas diluídas a pH 7,0 (WOLF, 1977).

Em geral, proteínas de reserva são globulinas, enquanto as albuminas são, principalmente, enzimas e proteínas ligadas ao metabolismo celular. As albuminas possuem maior valor biológico que as globulinas, por conterem maior teor de aminoácidos sulfurados e lisina. As proteínas restantes, glutelinas e prolaminas, estão fortemente ligadas às organelas e membranas celulares e são pouco estudadas (BHATTY, 1982).

As globulinas correspondem de 33,5 a 81% e as albuminas de 12 a 52,4% da proteína total da semente (DEHPANDE e NIELSEN, 1987; SATHE et al., 1984).

Uma importante característica da composição de várias proteínas de feijão, incluindo as duas maiores proteínas de reserva, é que elas contêm vários carboidratos ligados a elas covalentemente (glicoproteínas). Os monossacarídeos associados com diferentes frações protéicas incluem manose, galactose, glicose, glucosamina, xilose, fucose, arabinose e ramnose (JAFFÉ e HANNIG, 1965). Essas glicoproteínas podem ser caracterizadas por uma estrutura quaternária nas quais trímeros ou hexâmeros são formados não-covalentemente de subunidades de aproximadamente 60.000 daltons (STANLEY e AGUILERA, 1985).

A faseolina (também conhecida como glicoproteína II, vicilina ou globulina G₁) e a fito-hemaglutinina (ou lectina ou globulina G₂) são as principais proteínas de reserva do feijão, correspondendo a cerca de 50 e 10%, respectivamente, da proteína total presente (SATHE et al., 1984).

Para melhor entendimento da digestibilidade de proteínas de feijão comum, considerável atenção tem sido dirigida para a faseolina, a maior proteína de reserva dos feijões. A resistência de faseolina nativa ao ataque de enzimas digestivas de mamíferos *in vitro* tem sido demonstrada (ROMERO e RYAN, 1978) e é considerada como um importante fator na diminuição do valor nutritivo de feijão não-aquecido.

Essa baixa digestibilidade da faseolina em seu estado nativo pode ser atribuída a uma série de fatores, entre eles: a sua estrutura compacta, a estabilidade conferida à sua estrutura tridimensional pela molécula de carboidrato

e o impedimento estérico das proteases pela cadeia do polissacarídeo (NIELSEN, 1991).

Por aquecimento, a estrutura quaternária e a terciária da faseolina, mas não a secundária, são modificadas, com grande aumento da sua digestibilidade (DESHPANDE e DAMODARAN, 1989).

Faseolina é a maior fonte de metionina utilizável na semente, embora contenha um conteúdo pequeno deste aminoácido. Um estudo encontrou uma correlação positiva entre metionina e níveis de faseolina em três de quatro amostras analisadas (Gepts e Bliss, 1984, citados por REYES-MORENO e PAREDES-LÓPEZ, 1993).

A globulina G₂ (fito-hemaglutinina ou lectina) forma nos *Phaseolus* um complexo sistema de glicoproteínas com propriedades eritro e leucoaglutinantes de intensidade variável. Constitui cerca de 10% do total de proteínas das sementes, sendo dois terços desse total composto por lectinas do tipo albuminas, também proteínas de reserva sintetizadas no período final do processo de maturação das sementes. Embora possam ser encontradas nas folhas em pequenas quantidades, são armazenadas, principalmente, no cotilédone das sementes, dentro e fora dos corpos protéicos (SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

Em algumas variedades selvagens de *Phaseolus vulgaris* foi encontrado um terceiro tipo de proteína de estocagem. Essa fração foi denominada arcelina, em referência a Arcelia, uma cidade em Guerrero, México, onde uma das variedades de feijão foi coletada (OSBORN et al., 1986; ROMERO-ANDREAS et al., 1986).

Assim como as lectinas, a função da arcelina em feijões está relacionada com a defesa contra insetos e predadores (OSBORN et al., 1988).

Um grande número de pesquisadores tem mostrado que a proteína total do feijão e as frações dela isoladas são deficientes em aminoácidos sulfurados

(metionina, cisteína e cistina). No entanto, a concentração de lisina é elevada nas sementes da maioria das leguminosas, sendo consideradas de grande valor na

complementação das proteínas dos cereais, que, de modo geral, são pobres em lisina (SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

A metionina é considerada o aminoácido limitante do valor biológico das proteínas do feijão, por ser ele nutricionalmente essencial para o organismo animal. Apesar de cisteína e cistina poderem ser sintetizados pelos animais, eles são importantes, porque a metionina é um intermediário na biossíntese destes, tornando esse aminoácido essencial ainda mais limitante (SGARBIERI e WHITAKER, 1982). Assim, estudos de variação genética e composição aminoacídica têm sido centrados no conteúdo de metionina e cisteína (EVANS et al., 1974).

Ao comparar a composição de aminoácidos de algumas variedades de feijão com a do padrão FAO/OMS, além dos aminoácidos sulfurados, os outros aminoácidos limitantes da proteína do feijão, em ordem decrescente, são a valina, o triptofano e a treonina (BLANCO e BRESSANI, 1991).

OLIVEIRA (1973) constatou que a proteína das sementes das leguminosas não é capaz de suportar o crescimento de ratos, por causa da sua deficiência em aminoácidos sulfurados. O efeito benéfico da adição de metionina ao feijão já foi demonstrado (BRESSANI, 1973; OLIVEIRA, 1973). Essa informação sobre a qualidade nutritiva dos grãos das leguminosas tem grande significado, porque eles são considerados suplementos dos cereais que contêm baixo conteúdo de lisina e adequado teor de aminoácidos sulfurados. Por isso, muitos não consideram totalmente acidental o importante papel desempenhado pelas dietas formadas de misturas de cereais e grãos de leguminosas nos muitos séculos de evolução da humanidade (VIEIRA, 1992).

SGARBIERI et al. (1979) mostraram que a porcentagem disponível de metionina, para ratos, variou de 29,3% na variedade Carioca até 40,6% para a Rico 23. Também EVANS et al. (1974) constataram que ratos alimentados com feijão cozido excretavam nas fezes 49% da metionina e 25% da cisteína ingeridas.

EVANS e BAUER (1978), utilizando a técnica de balanço metabólico em ratos em crescimento, determinaram a biodisponibilidade da metionina no

feijão *navy* (*P. vulgaris* L.). Foi constatado que toda a metionina sintética adicionada a dietas à base de feijão cozido era absorvida pelos animais, indicando não existir no feijão algo que interfira na absorção da metionina livre. No entanto, apenas 50% da metionina e 41% da cistina já presentes no feijão eram absorvidos. Segundo os autores, o ácido fítico parecia não interferir na utilização desses aminoácidos.

SGARBIERI e WHITAKER (1982) estudaram a eficiência protéica das diferentes frações das proteínas do feijão Rosinha G2, com e sem suplementação com metionina. O PER variou de 0,50 para a fração albumina a 0,98 para as globulinas; e a suplementação com 3% de metionina e 2% de cisteína elevou os valores para 3,98 e 4,47, respectivamente.

O tratamento térmico também reduz significativamente o teor de lisina disponível em consequência da ocorrência de reação de Maillard, resultando no bloqueio de grupamentos amino-laterais por compostos do tipo carbonil formados durante a oxidação das gorduras ou com grupos carboxílicos livres de aminoácidos, como os ácidos glutâmico ou aspártico (BURR, 1973).

A baixa utilização biológica das proteínas de *Phaseolus vulgaris* é atribuída a vários fatores, como: baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados; estrutura compacta de proteínas nativas de feijões, que podem resistir à proteólise; compostos antinutricionais, que podem modificar a digestibilidade e alterar a liberação dos aminoácidos; e excreção elevada de nitrogênio endógeno (WU et al., 1995).

Possivelmente, um dos fatores que mais afeta a utilização das proteínas do feijão é a sua digestibilidade, e até agora não se sabe com certeza se esse efeito é causado por uma descarga muito rápida do intestino ou por resistência destas proteínas à hidrólise das enzimas gastrointestinais. Tem-se sugerido que a baixa solubilidade de algumas frações protéicas reduz sua susceptibilidade ao ataque enzimático. Numerosos estudos confirmam o fato de que o clássico

inibidor da tripsina é termolábil, de modo que não poderia ser responsável pela baixa digestibilidade das proteínas do feijão cozido (GOMEZ-BRENES et al., 1983).

A digestibilidade das proteínas do feijão, em ratos, situa-se entre 40 e 70% (BRESSANI e ELIAS, 1984). Em humanos, esta digestibilidade é ainda menor, atingindo não mais que 60% do nitrogênio ingerido (BRESSANI, 1983).

O valor nutritivo da proteína de grãos de *Phaseolus vulgaris* é aumentado pelo processamento térmico, especialmente pelo tratamento por calor úmido (Gallardo et al., 1974, citados por POEL et al., 1990). Isto pode ser devido à desnaturação de fatores antinutricionais de natureza protéica, já que, para exercer seus efeitos negativos *in vivo*, estes fatores precisam manter sua integridade estrutural (Burns, 1987, citado por POEL et al., 1990). Além disso, o aumento do valor nutricional pode ser o resultado de uma maior acessibilidade das proteínas do feijão ao ataque enzimático (Romero e Ryan, 1978, citados por POEL et al., 1990).

A digestibilidade de proteína de feijão cru geralmente se situa entre 25 e 60%, mas, quando cozido, este valor sobe para 65 a 85%, dependendo da variedade e do processo de cocção usado (Chang e Satterlee, 1982, citados por REYES-MORENO e PAREDES-LÓPEZ, 1993).

O Quadro 3 mostra os resultados dos trabalhos de KAKADE e EVANS (1965) no que se refere a PER e crescimento de ratos alimentados com feijões *navy*, crus e autoclavados (121°C), por diferentes tempos.

2.3. Fatores antinutricionais presentes no feijão

O feijão comum possui alguns atributos indesejáveis, como: fitatos, fatores flatulentos, compostos fenólicos, inibidores enzimáticos, hemaglutininas (lectina) e alergenicos, os quais devem ser removidos ou eliminados para efetiva utilização do feijão (GUPTA, 1987; SATHE et al., 1984). O Quadro 4 apresenta algumas das principais características nutricionais de feijões comuns.

Quadro 3 - Efeito de feijões *navy* crus e autoclavados (121°C) no crescimento de ratos

Fonte de Proteína	Mudança de Peso (g)	Consumo de Alimento (g)	PER
Caseína	98,0	286	3,41
Feijões crus	-13,2	92	todos morreram
Feijões autoclavados por 5 min	35,0	226	1,57
Feijões autoclavados por 15 min	25,0	197	1,26
Feijões autoclavados por 30 min	21,0	198	1,09
Feijões autoclavados por 1 h	12,0	167	0,67
Feijões autoclavados por 4 h	-8,0	164	0

Fonte: KAKADE e EVANS, 1965.

Quadro 4 - Características nutricionais de feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*)

1. Fatores positivos:
a. Alto conteúdo de proteína
b. Alto conteúdo de lisina
c. Excelente complementação protéica para os grãos de cereais
2. Fatores limitantes:
a. Fatores físicos
a.1. Difícil cozimento
b. Substâncias antifisiológicas
b.1. Compostos polifenólicos
b.2. Hemaglutininas
b.3. Inibidores de tripsina
b.4. Ácido fítico
b.5. Fatores de flatulência
c. Fatores nutricionais
c.1. Deficiência de aminoácidos sulfurados
c.2. Baixa digestibilidade protéica

Fonte: Bressani, 1981, citado por BRESSANI (1983).

2.3.1. Polifenóis

Feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*) e outras leguminosas contêm uma quantidade variável de polifenóis, como taninos condensados. O nível destes está relacionado com a cor da semente, e o branco possui quantidades muito baixas, enquanto o vermelho e o preto têm níveis significativamente maiores (BRESSANI et al., 1983; STANLEY et al., 1990).

A maior concentração de polifenóis é encontrada em cascas de sementes coloridas, e a menor, na casca de sementes brancas ou em outra parte anatômica da semente (BRESSANI et al., 1991).

ELIAS et al. (1979) relataram que o conteúdo de polifenóis na semente é maior para o feijão-vermelho e o feijão-preto que nas variedades brancas.

Segundo SCHNEEMAN (1990), tem-se constatado que os polifenóis são solúveis em água e grande quantidade dos mesmos permanece presente na água de cocção; os demais fatores antinutricionais do feijão (inibidores de tripsina e lectinas) são inativados com aquecimento; e a presença de fibras em alta quantidade tende a reduzir a digestibilidade e absorção de proteínas de baixa qualidade de dieta.

Compostos polifenólicos são classificados como ácidos fenólicos e derivados, taninos e flavonóides. Os flavonóides são subdivididos em antocianinas, flavonas, flavonóis e substâncias relacionadas (SALUNKHE et al., 1982).

As características e o efeito das ligações entre proteína e polifenóis dependem do tipo de interação, covalente ou não-covalente. Ligações não-covalentes podem ocorrer em pH ácido ou neutro e são reversíveis. Os polifenóis que podem sofrer estas ligações são principalmente os polifenóis poliméricos ou taninos, embora polifenóis monoméricos ou não-taninos também possam se ligar não-covalentemente às proteínas. Como consequência, o valor nutricional é diminuído e a estrutura tridimensional das proteínas é modificada, alterando suas propriedades funcionais. As interações covalentes entre polifenóis e proteínas, juntamente com uma série de transformações enzimáticas,

contribuem para o fenômeno de escurecimento. Estas interações são irreversíveis e, caso aminoácidos essenciais estejam envolvidos nas ligações com polifenóis, haverá decréscimo do valor nutricional do alimento, além de alterações nas qualidades organolépticas (HERNANDEZ et al., 1991).

Além da formação de complexos com proteínas, tornando-as indisponíveis, os polifenóis podem inibir enzimas digestivas (STANLEY e AGUILERA, 1985). Os polifenóis, dentre os fatores antinutricionais, são os que mais contribuem para a baixa digestibilidade do feijão em animais e humanos. Isto pode ser explicado pela formação de complexos entre os polifenóis e proteínas, os quais são insolúveis e de baixa digestibilidade, tornando a proteína parcialmente indisponível, ou através da inibição das enzimas digestivas e aumento do nitrogênio fecal (BRESSANI e ELIAS, 1980).

O Quadro 5 mostra a distribuição de polifenóis em diferentes partes estruturais da semente.

Quadro 5 - Distribuição de polifenóis em frações anatômicas de *P. vulgaris*

Unidade	Origem da amostra	Cor da casca	Semente inteira	Cotilédones	Revestimento da semente
Valores de equiv. catequina (mg/g)	Wisconsin - EUA ¹	branco	2,31	2,17	---
		preto	6,65	2,90	---
		bronze	7,80	2,04	---
Valores de equiv. catequina (mg/g)	Porto Rico ¹	branco	2,40	0,44	---
		preto	5,30	0,98	---
		vermelho	12,56	1,01	---
Ácido Tanínico (%)	Guatemala ²	branco	3,85	4,15	1,30
		preto	7,95	5,25	42,50
		vermelho	9,30	5,00	38,00

¹ MA e BLISS (1978) e ² ELIAS et al. (1979).

2.3.1.1. Taninos

Taninos e proteínas podem interagir, formando complexos insolúveis e solúveis, sendo os primeiros favorecidos pelo pH próximo do ponto isoelétrico da proteína e pelo excesso de ácido tânico (VAN BUREN e ROBINSON, 1969). A intensidade das ligações entre taninos e proteínas depende de vários fatores. Essa interação poderá ocorrer tanto com as proteínas dos alimentos, como com as enzimas do trato gastrointestinal (COELHO e LAJOLO, 1993). As proporções de taninos e proteínas envolvidos na reação são influenciadas por álcool, sais, pH e tipo (grau de polimerização) dos taninos envolvidos. Os tipos de proteínas e taninos influenciam a reação; por exemplo, maior precipitação ocorre com gelatina de alto peso molecular (VAN BUREN e ROBINSON, 1969).

Taninos de *Phaseolus vulgaris* são procianidinas. Há indícios de que o tamanho da cadeia dos taninos não seja o único critério associado com precipitação de proteínas. Diferenças na solubilidade dos complexos taninos/proteínas podem ser devidas a diferentes estruturas secundárias e terciárias dos taninos. Os taninos de feijões da variedade *Pinto* têm maior afinidade que outros taninos com os inibidores de tripsina de soja (ASQUITH e BUTLER, 1986).

O relacionamento entre a concentração de taninos e a qualidade protéica é também evidente quando a proteína é suplementada com metionina, eliminando, assim, a possibilidade da função que esses aminoácidos desempenham na qualidade protéica dos alimentos (BRESSANI e ELIAS, 1980).

Grupos hidrofóbicos parecem estar envolvidos na formação e estabilização de complexos tanino-proteína. Um estudo da interação entre taninos condensados e poliaminoácidos indicou que o número de grupos metileno na cadeia lateral do aminoácido foi positivamente relacionado com a magnitude da interação. A presença de doadores de hidrogênio na forma de hidroxifenólicos, em taninos, e de aceptores de hidrogênio, na forma de funções carbonila, nas ligações peptídicas das proteínas, favorece a formação de pontes de hidrogênio. Além disso, desde que ambos os grupos contenham regiões hidrofóbicas, núcleo

aromático dos taninos e cadeias alifática e aromática laterais dos aminoácidos da proteína, é possível que esses participem do fenômeno de interação (OH et al., 1980).

Os taninos compreendem uma pequena parte do diversificado grupo de fenólicos de plantas, que variam de ácidos fenólicos simples C₇-C₉, dos flavonóides C₁₆ às ligninas inertes altamente polimerizadas. Muita confusão existe na literatura, porque fenólicos simples, como ácido clorogênico, que não têm propriedades de taninos em termos de precipitação protéica ou reação de adstringência com os muito usados reagentes de Folin-Dennis, agem do mesmo modo que os taninos verdadeiros. Os polímeros fenólicos se tornam menos adstringentes e reativos em relação às proteínas, suas solubilidades diminuem e eventualmente eles se tornam ligados aos componentes da parede celular, quando eles podem ser medidos junto com lignina (MANGAN, 1988).

Embora os taninos sejam quimicamente um grupo diversificado e não tão bem definido, eles são normalmente divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (MANGAN, 1988). Os taninos hidrolisáveis são facilmente hidrolisados, química ou enzimaticamente, e podem ser quebrados em açúcares e ácidos carboxílicos fenólicos (SAVELKOUL et al., 1992). Os taninos condensados são os mais difundidos e típicos entre taninos de plantas e consistem de oligômeros dos “flavan-3-ols” (catequinas) e resíduos flavonóis que produzem tipicamente antocianidinas (cianidina e pelargonidina) na degradação ácida (MANGAN, 1988). Taninos condensados causam diminuição na digestibilidade das proteínas e dos carboidratos como resultado de formação de complexos insolúveis resistente às enzimas (SAVELKOUL et al., 1992). As reações de ambos (taninos hidrolisáveis e condensados) com proteínas dependem da configuração espacial das moléculas e da reatividade dos grupos fenólicos. Diferentes proteínas têm diferentes afinidades por taninos e reagem mais eficientemente em valores de pH próximos do ponto isoelétrico (MANGAN, 1988).

O peso molecular dos taninos está usualmente entre 500 e 3.000, o que os fazem solúveis e pequenos o suficiente para se orientarem entre as cadeias protéicas, tendo grupos fenólicos suficientes para formar ligações sob condições favoráveis de concentração e pH (MANGAN, 1988).

A quantificação de polifenóis em grãos e sementes é problemática devido, em parte, à diversidade de métodos usados e à presença de fatores interferentes. A eficiência na extração de polifenóis depende do solvente utilizado (CARMONA et al., 1991). Quando taninos estão ligados a proteínas, eles não são detectados por métodos de rotina (BUTLER et al., 1980).

O conteúdo de taninos em feijões comuns varia de 0 a 2,0%, dependendo da espécie do feijão e cor da casca (REDDY et al., 1985). *Phaseolus vulgaris* branco, preto e vermelho contêm, respectivamente, 0,34 a 0,42, 0,57 a 1,15 e 0,95 a 1,29% de polifenóis como ácido tânico, principalmente na superfície da casca. Assim, a qualidade protéica é maior para *Phaseolus vulgaris* branco do que para o preto e o vermelho (BRESSANI e ELIAS, 1980). Foi constatado que a relação taninos/polifenóis não-taninos em sementes de feijão-branco é substancialmente menor que em variedades de feijão-preto (CARMONA et al., 1991).

DESHPANDE et al. (1982) verificaram que o conteúdo de taninos em feijões depende em grande parte da presença ou não do tegumento e da coloração dos mesmos. O conteúdo de taninos dos feijões pigmentados inteiros e descascados variou de 33,7 a 282,8 mg de equivalentes catequina/100g de feijões inteiros e de 10,0 a 28,7mg de equivalentes catequina/100g de feijões descascados. Os taninos não foram detectados nos cultivares de semente branca (*Sanilac*, *Great Northern* e *Small White*).

O descascamento removeu a maioria dos taninos dos feijões coloridos. Assim, os feijões descascados de todos os cultivares pigmentados investigados não diferiram em seus conteúdos de taninos. Porém, a total eliminação de taninos após o descascamento não foi observada (DESHPANDE et al., 1982).

A digestibilidade varia conforme o cultivar, com sementes brancas tendo digestibilidade maior e as vermelhas, mais reduzida (REDDY et al., 1985), fato que foi associado ao teor e à natureza dos taninos da casca das variedades coloridas (AW e SWANSON, 1985).

A digestibilidade das proteínas decresce com o aumento da pigmentação do tegumento da semente. Os pigmentos são, geralmente, compostos fenólicos, que podem interagir com as proteínas do feijão, decrescendo a sua digestibilidade e utilização. Os polifenóis encontram-se nas plantas, como metabólitos secundários, raramente ativos. Sua habilidade de formar compostos complexos e de precipitar as proteínas faz com que sejam importantes sob o ponto de vista nutricional (BRESSANI et al., 1991). Por exemplo, Jaffe, 1950, citado por SGARBIERI e WHITAKER (1982), encontrou valores de 76,8; 79,5 e 84,1% para digestibilidade *in vivo* de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) preto, rosa e branco, respectivamente. Possivelmente os inibidores enzimáticos, como os taninos ou polifenóis, podem ser parcialmente responsáveis por essa baixa digestibilidade, mas esses compostos nas leguminosas não têm sido estudados com profundidade, existindo poucos estudos em animais que indiquem que eles afetam diretamente a qualidade nutricional. Não obstante, há evidências que fazem pensar que os polifenóis são os que contribuem mais para a baixa digestibilidade da proteína do feijão (BRESSANI et al., 1991).

Feijões com um conteúdo maior de polifenóis geralmente respondem melhor à adição de metionina do que aqueles com menores conteúdos. Parece que pequenas quantidades de compostos fenólicos podem ser absorvidas e desintoxicadas, num processo que utiliza metionina adicionada à proteína do feijão. De acordo com essa hipótese, a adição de metionina aumenta a qualidade protéica, principalmente em feijões com grande quantidade de tanino. Assim, a metionina adicionada não apenas melhora a qualidade da proteína do feijão, mas também atua na desintoxicação de taninos (BRESSANI et al., 1983).

Aparentemente, a moagem é essencial para liberação de taninos de células da casca dos feijões. Quando extraídos de grãos inteiros, apenas 10-20%

dos taninos totais foram detectados em metanol absoluto, mesmo depois de 48 horas de extração. Cascas de feijão contêm aproximadamente de 5 a 7% de taninos, com base no seu peso. Quando expresso em termos de grão inteiro, esse valor é de cerca de 1,1 a 2,5 vezes maior quando a extração é feita na farinha do feijão, em relação ao feijão inteiro (DESHPHANDE e CHERYAN, 1985).

Os valores médios de NPR e de digestibilidade por cor de grão encontram-se no Quadro 6. Esses dados indicam que, em valores médios, o feijão-branco tem melhor NPR e maior digestibilidade que o roxo, o preto ou o marrom. A variação na digestibilidade para todas as amostras, foi de 65,7 a 83,4%, enquanto a NPR foi de 1,16 a 2,62 (BRESSANI e ELIAS, 1984).

Devido à localização preferencial dos taninos na casca do grão, a remoção física por descascamento ou moagem, com posterior separação das cascas, pode diminuir o conteúdo de taninos nos grãos e aumentar a qualidade nutricional (BRESSANI e ELIAS, 1980; BRESSANI et al., 1983; DESHPANDE et al., 1982; ELIAS et al., 1979; SALUNKHE et al., 1982). O descascamento elimina de 68 a 95% dos taninos em feijões-comuns (Quadro 7) (DESHPANDE et al., 1982). Entretanto, o mecanismo de descascamento dos grãos pode acarretar perdas substanciais de proteínas e outros nutrientes, o que pode compensar os efeitos benéficos da remoção de taninos pelo descascamento (REDDY et al., 1985).

É possível que alguns taninos se difundam para o endosperma do cotilédone e se liguem às proteínas durante o molho. Soluções de bicarbonato de sódio ou mistura de sais são mais eficientes que água na retirada de taninos (REYES-MORENO e PAREDES-LÓPEZ, 1993).

O cozimento não é capaz de destruir os taninos, mas estes são parcialmente removidos com o caldo do cozimento (BRESSANI e ELIAS, 1980). Segundo trabalho de ZIENA et al. (1991), menos de 10% dos taninos totais são decompostos durante o cozimento, enquanto cerca de 50% são carregados para o líquido de cocção.

Quadro 6 - Valores médios de digestibilidade protéica (DP) e de NPR em feijão-comum por cor e total (média \pm desvio-padrão)

Cor	n	DP(%)	NPR
Preto	21	71,5 \pm 3,3	1,79 \pm 0,28
Roxo	23	72,4 \pm 2,9	1,80 \pm 0,29
Branco	10	76,6 \pm 3,5	2,31 \pm 0,26
Marrom	3	70,7 \pm 3,8	1,94 \pm 0,18
Todos	57	72,7 \pm 3,4	1,89 \pm 0,25

Fonte: BRESSANI e ELIAS (1984).

Quadro 7 - Conteúdo de taninos de feijões inteiros e descascados^a

Cultivar	Conteúdo de Taninos (mg equivalente catequina/100g)		% Redução no Descamento
	Feijões Inteiros	Feijões Descascados	
<i>Sanilac</i>	ND ^b	ND	-
<i>Great Northern</i>	ND	ND	-
<i>Small White</i>	ND	ND	-
<i>Cranberry</i>	76,3	10,0	86,9
<i>Viva Pink</i>	122,1	10,4	91,5
<i>Pinto</i>	264,7	14,2	94,6
<i>Light Red kidney</i>	152,2	22,2	85,4
<i>Dark Red kidney</i>	105,3	28,7	72,7
<i>Small Red</i>	282,8	19,0	93,3
<i>Black Beauty</i>	33,7	10,8	68,0

^a Média de determinações triplicadas em base seca e ^b ND = não-detectado.
Fonte: DESHPANDE et al. (1982).

Cerca de 60, 67 e 37% dos polifenóis totais de feijões crus permaneceram nos grãos pretos, brancos e vermelhos, respectivamente, após o cozimento (BRESSANI et al., 1983). A água de cocção continha menos de 20% dos polifenóis totais.

No entanto, embora relativamente grandes quantidades de polifenóis possam ser eliminadas na água de lavagem e na água utilizada para o cozimento, o resíduo é retido, principalmente pelos cotilédones. Isto pode ser devido à migração aparente dos taninos do tegumento para os cotilédones. As quantidades de taninos ingeridas irão, então, depender de como os feijões são processados e consumidos (BRESSANI e ELIAS, 1980).

Os taninos de diferentes plantas têm diferentes atividades biológicas que podem variar com as espécies animais, o pH e a natureza da proteína que está sendo complexada (PEREZ-MALDONADO et al., 1995). A importância do conteúdo de taninos para o valor nutricional de sementes de feijão é também sugerida pelas diminuições na digestibilidade *in vitro* (ROMERO e RYAN, 1978).

Efeitos biológicos de taninos em humanos e animais variam consideravelmente. DESHPANDE et al. (1982) revisaram os efeitos deletérios de vários tipos de taninos e os agruparam nas seguintes categorias: diminuição do consumo de alimento, formação de complexos taninos/proteínas ou outros componentes dos alimentos, inibição de enzimas digestivas, aumento da excreção de proteína endógena, efeitos dos taninos no trato digestivo e toxicidade dos taninos absorvidos e seus metabólitos.

Taninos condensados são também conhecidos como tendo efeitos benéficos no metabolismo e na nutrição animal. Os efeitos benéficos registrados em ruminantes têm sido prevenção de inchaços e formação de complexos tanino-proteína, que protege a proteína da dieta da degradação no rúmen e, subsequentemente, produz a absorção do aminoácido e utilização pelo animal ruminante. As proteínas salivares, ricas em prolina e glicoproteínas, têm uma afinidade muito grande por taninos, e é proposto que esse mecanismo proteja

algumas espécies animais contra a toxidez dos taninos (PEREZ-MALDONADO et al., 1995).

2.3.1.2. Flavonóides

Feijões-comuns (*Phaseolus vulgaris*) e outras leguminosas contêm uma quantidade variável de polifenóis, e o nível dos mesmos está relacionado com a cor do grão. Diferentes polifenóis (antocianinas) são responsáveis pelas cores do tegumento de feijões.

Os compostos de cores que variam do vermelho ao azul, passando por uma gama intermediária de cores, são substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides, denominadas antocianinas (MAZZA e BROUILLARD, 1987a). As antocianinas são glicosídeos das antocianidinas, cuja estrutura básica é a estrutura do cátion flavilium (2-fenilbenzopirilium). Todas as antocianinas são compostas de duas ou três partes: a estrutura básica, que é uma aglicona (antocianidina); o açúcar; e, freqüentemente, um ácido (FRANCIS, 1992).

Segundo HRAZDINA (1982), são conhecidas 225 antocianinas individuais. Já FRANCIS (1992) informa que existe um grande número de possíveis combinações da antocianidina com o açúcar e o grupo acil, chegando a formar 300 antocianinas conhecidas.

As antocianinas podem ser glicosiladas por diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7, sendo os mais freqüentes ligados nas posições 3-hidroxil ou 5-hidroxil e o menos comum, na posição 7-hidroxil. Os açúcares mais comuns são glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose ou frutose. O número de grupos hidroxílicos na molécula, o grau de metilação desses grupos, a natureza e o número de açúcares ligados à molécula e a posição dessas ligações, bem como a natureza e o número de ácidos alifáticos e, ou, aromáticos ligados ao açúcar na molécula, indicam as diferenças entre as várias antocianinas (FRANCIS, 1992).

As antocianinas e antocianidinas mostram absorvância intensa na região compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm e uma absorvância muito menos intensa na região entre 270 e 280 nm. A posição dos

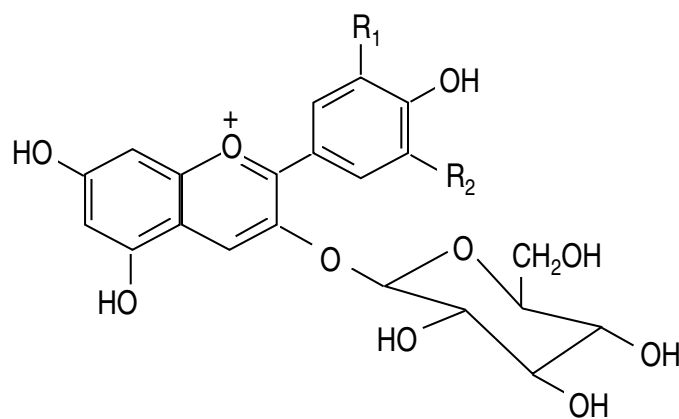
picos varia consideravelmente com o solvente e o pH das soluções (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As antocianinas purificadas de *P. vulgaris* têm sido delphinidinas 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo (HARBORNE, 1967) ou uma mistura de pelargonidina e cianidina 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo (Yoshikura e Hamaguchi, 1971, citados por MARKAKIS, 1982). As cascas de feijões analisadas por Frenstra, 1960, citado por MARKAKIS (1982), continham adicionalmente petunidina, malvidina 3-glicosídeo e delphinidina 3,5-diglicosídeo. No entanto, a casca de um cultivar japonês mostrou falta de derivados de pelargonidina, mas continha delphinidina, petunidina e malvidina 3-glicosídeo e malvidina 3,5-diglicosídeo (Okita et al., 1972, citados por MARKAKIS, 1982).

De acordo com STANTON e FRANCIS (1966), em feijões do cultivar *Canadian Wonder* foram encontrados: pelargonidina 3-monoglicosídeo, cianidina 3-monoglicosídeo, pelargonidina 3,5-diglicosídeo, delphinidina 3-monoglicosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo. Outros cultivares continham essas antocianinas em diferentes proporções ou, em alguns, elas podem estar ausentes.

NOZZOLILO (1971) estudou plantas novas de pigmentação vermelha de feijão *mung* (*Phaseolus aureus* Roxb.), Realeza (cultivares *Black Wax* de feijão *bush Phaseolus vulgaris* L.) e feijão *runner Hammond's Dwarf* (*P. coccineus* L.). Encontrou como resultados que delphinidina 3-glicosídeo é o principal pigmento de feijão *mung* e que malvidina e pelargonidina glicosídeos estão presentes em quantidades menores. Malvidina 3,5-diglicosídeo é predominante em planta nova de duas variedades de feijão *bush* e em haste de planta nova de feijão *runner*.

TSUDA et al. (1994a) isolaram cianidina 3-O- β -D-glicosídeo e pelargonidina 3-O- β -D glicosídeo de feijão-vermelho e delphinidina 3-O- β -D-glicosídeo de feijão-preto. As estruturas desses pigmentos são mostradas na Figura 2.



$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H} \rightarrow$ cianidina 3-O- β -D-glicosídeo
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H} \rightarrow$ pelargonidina 3-O- β -D-glicosídeo
 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH} \rightarrow$ delphinidina 3-O- β -D-glicosídeo
 Fonte: TSUDA et al., 1994a.

Figura 2 - Estruturas de antocianinas de feijão.

O significado biológico das antocianinas presentes no tegumento de feijões foi estudado por STANTON e FRANCIS (1966). A concentração de flavonóides nas sementes varia de acordo com as condições de crescimento e colheita das mesmas. Como a concentração de pelargonidina 3-glicosídeo (P-3-g) é alta no tegumento do cultivar de feijão *Canadian Wonder*, foi testado o efeito desta antocianina na inibição e estimulação do crescimento de vários microrganismos. Em nível de 1.000ppm, P-3-g inibiu o crescimento de algumas espécies de *Rhizobium*. Essas interações entre espécie hospedeira e simbiote, sem dúvida, influenciam o desenvolvimento da microflora no tegumento de leguminosas.

2.3.2. Lectinas (fito-hemaglutininas)

A habilidade de extratos de grãos de feijão em aglutinar células vermelhas do sangue de várias espécies animais foi descoberta em 1908 (Landsteiner e Raubitscheck, citados por OSBORN, 1988). O nome “lectina” foi dado às proteínas que eram responsáveis por essa atividade (Boyd e Shopleigh, 1954, citados por OSBORN, 1988).

Lectinas são complexas misturas de proteínas com atividade de eritrosedimentação e transformação linfocítica, presentes em ambas as frações albumina e globulina (Pulsztai e Stewar, 1978, citados por MARTINEZ-ARAGON et al., 1995), e são o maior componente da fração globulina-2 (Brown et al., 1981, citados por MARTINEZ-ARAGON et al., 1995). No entanto, o estudo de MARTINEZ-ARAGON et al. (1995), usando SDS-PAGE, mostrou claramente que as duas subunidades de lectina estão presentes na fração albumina, sendo a fração globulina livre de lectina, o que contrasta com os estudos anteriores.

Nas espécies do gênero *Phaseolus*, as lectinas têm sido encontradas principalmente nas sementes. As lectinas se localizam no citoplasma dos cotilédones e das células embrionárias, onde elas aparecem durante o desenvolvimento inicial e a diferenciação do embrião. Durante a germinação da semente o conteúdo de lectina decresce em velocidade paralela à da perda das proteínas de reserva (SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

Os pesos moleculares das subunidades de lectina variam de 29.000 a 36.500, e os pontos isoelétricos variam de pH 4,9 a 7,9, com a maioria na faixa de pH 5 a 6 (OSBORN, 1988).

Outra observação interessante é a de que as lectinas tóxicas aparecem principalmente nas variedades pigmentadas, quando comparadas com as brancas ou não-pigmentadas (HONOVAR et al., 1962).

A ação das lectinas tem sido atribuída à ligação às células da mucosa intestinal, causando mal funcionamento, ruptura e lesão no intestino delgado e conseqüentemente, interferência na absorção de nutrientes, e também à direta ação destes sobre as enzimas digestivas (THOMPSON e SERRAINO, 1986).

Sérios danos causados pelas lectinas às células epiteliais e às microvilosidades já foram mostrados utilizando microscopia ótica e eletrônica. As lectinas reagem com as células intestinais *in vivo* e causam ruptura destas no

duodeno e no jejuno. Apesar de um pouco diminuída, a absorção ainda ocorre, provavelmente devido às células intactas do intestino delgado (SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

A função das lectinas em feijão é desconhecida; no entanto, algumas de suas funções foram sumarizadas por Liener, 1976, citado por SGARBIERI e WHITAKER (1982), como se segue: (1) elas agem como anticorpos contra bactérias de solo; (2) atuam como barreiras das plantas contra ataque de fungos, inibindo polissacarases fúngicas; (3) atuam no transporte ou no armazenamento de açúcares; e (4) desempenham importante papel no desenvolvimento e na diferenciação de células embrionárias. Outras pesquisas indicam que as lectinas podem desempenhar um papel na inter-relação simbiótica entre plantas leguminosas e bactérias ou na proteção contra patógenos e insetos (OSBORN, 1988).

2.3.3. Inibidores de tripsina

O baixo valor nutritivo de certos grãos comestíveis crus, como feijão ou soja, é usualmente atribuído à presença de um número de fatores tóxicos não estáveis ao calor, incluindo inibidores de tripsina e hemaglutininas.

O feijão, assim como as leguminosas em geral, contém inibidores protéicos das proteases digestivas humanas, tripsina e quimiotripsina. Desta forma, eles podem interferir na digestibilidade de proteínas da dieta, retardar crescimento e produzir hipertrofia do pâncreas. Porém, o aquecimento destrói os inibidores e melhora o valor nutritivo de proteínas de leguminosas (GEIL e ANDERSON, 1994). Esses inibidores são do tipo Bowman-Birk e são capazes de inibir tripsina e quimiotripsina independente e simultaneamente, por conterem dois sítios reativos diferentes (WU e WHITAKER, 1991).

Existem dois tipos de inibidores de tripsina, com base no aminoácido no qual se localiza o sítio de ligação no inibidor. Um tipo contém um resíduo de lisina, como o inibidor Bowman-Birk da soja e o inibidor do feijão-lima, e o outro tipo contém um resíduo de arginina, como o iso-inibidor II do feijão Grande

do Norte. O isoínibidor I do feijão Grande do Norte possui lisina no sítio de ligação (WILSON e LASKOWSKI, 1973). Os três isoínibidores do feijão-rosa Brasileiro são do tipo inibidores de tripsina (SGARBIERI e WHITAKER, 1981), como no inibidor de tripsina e de quimiotripsina de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (SMIRNOFF et al., 1979). Trabalhos subseqüentes mostraram que o sítio de ligação específico para a quimiotripsina contém um resíduo de tirosina, fenilalanina ou metionina, enquanto o da elastase contém um resíduo de alanina ou de serina (LASKOWSKI e KATO, 1980).

Os inibidores de tripsina e quimiotripsina concentram-se nas sementes. Em geral, essas proteínas apresentam baixa qualidade nutricional em função de sua composição aminoacídica peculiar: teores reduzidos de metionina, glicina, valina, fenilalanina, tirosina e triptofano. São particularmente resistentes à desnaturação, e alguns podem apresentar atividade mista, inibindo tanto a tripsina como a quimiotripsina (SGARBIERI e WHITAKER, 1982; SGARBIERI e WHITAKER, 1981).

GOMES et al. (1979) isolaram uma fração protéica de feijões *navy* (*Phaseolus vulgaris* L. cultivar *Sanilac*), que inibiu fortemente a atividade enzimática da tripsina e quimiotripsina. Esta fração protéica foi isolada através de cromatografia de afinidade, utilizando tripsina imobilizada em agarose. O inibidor foi caracterizado por alto conteúdo de cisteína, baixo conteúdo de metionina e ausência de triptofano. Um inibidor de tripsina com composição similar foi também isolado, utilizando filtração gélica e cromatografia de troca iônica em dietilaminoetil (DEAE) celulose (Wagner e Riehm, 1967, citados por GOMES et al., 1979).

O peso molecular dos inibidores se situa entre 8 e 10 kDa, caracterizando-se pelo alto teor de cisteína (12 a 14 mol/mol proteína), pela ausência de carboidratos e metionina e pelo baixo conteúdo de glicina, alanina e aminoácidos aromáticos (WU e WHITAKER, 1991).

Os inibidores de proteases são também importantes do ponto de vista nutricional. Apesar de representarem apenas 2,5% da proteína total do feijão,

parecerem contribuir com cerca de 40% do conteúdo total de cisteína. No entanto, esse aminoácido não seria biodisponível, devido à alta resistência ao ataque enzimático apresentada pelos inibidores (KAKADE et al., 1969).

O cozimento elimina em larga escala a atividade antitripsina de sementes inteiras e cotilédones. O remanescente, ou atividade resistente ao calor, pode ser atribuído à presença de polifenóis nas partes anatômicas, embora uma destruição incompleta dos verdadeiros inibidores de tripsina deva ser considerada, sendo a atividade final um somatório das duas inibições (FERNÁNDEZ et al., 1982).

2.3.4. Fitatos

Fitato é a forma de armazenagem de fósforo encontrada em todas as sementes de leguminosas, em concentrações variando em torno de 0,3 a mais de 2,5% em base seca (STANLEY e AGUILERA, 1985). Outros autores citam valores em níveis de aproximadamente 5% p/p (DE BOLAND et al., 1975).

Ácido fítico é um dos antinutrientes em feijões secos e serve como fonte de fósforo (GRAF, 1983a). Responde por mais de 80% do total de fósforo do feijão e se localiza preferencialmente no cotilédone (DESHPANDE et al., 1982), embora não se saiba se ele está biologicamente disponível.

Numerosos inositóis poli-fosforilados podem ser encontrados na natureza, e, dependendo do complexo formado, uma grande variedade de compostos pode existir. O ácido fítico pode ser comumente chamado de ácido mio-inositol hexafosfórico. Nove esterioisômeros de inositóis são possíveis; no entanto, apenas a forma mio tem sido isolada de plantas, enquanto isômeros hexafosfatados têm sido identificados no solo (MAGA, 1982).

O termo fitina sugere sais de cálcio ou magnésio do ácido fítico, enquanto fitato pode significar de mono a deca-ânion de ácido fítico (MAGA, 1982).

REDDY e PIERSON (1987) encontraram que o ácido fítico de feijões *Great Northern* estavam presentes na forma hidrossolúvel (80%), assim como na forma insolúvel (20%), como sais de cálcio, magnésio ou potássio em associação com proteínas.

Valores de ácido fítico em feijões-comuns variam de 0,6 a 2,7% (DESHPANDE et al., 1982; LOLAS e MARKAKKIS, 1975). Esta variação pode ser devida, em parte, à diferença de variedades e cultivares e aos métodos de determinação (REYES-MORENO e PAREDES-LÓPEZ, 1993).

LOLAS e MARKAKKIS (1975) mediram o nível de ácido fítico em 50 variedades de *P. vulgaris* cultivadas por um período de dois anos e encontraram valores entre 0,54 e 1,58%. Foi também encontrada uma alta correlação entre o conteúdo total de fósforo e o nível de ácido fítico. Eles isolaram, ainda, o complexo proteína-fitato e verificaram que 99% do total de ácido fítico estava na forma hidrossolúvel.

Os dados do conteúdo de ácido fítico de feijões inteiros e descascados estão no Quadro 8.

Fitatos interferem no metabolismo de minerais, principalmente zinco (LIKUSKI e FORBES, 1964; NAVERT et al., 1985; OBERLEAS et al., 1966) e cálcio (GRAF, 1983b). Existem controvérsias sobre o efeito dos fitatos sobre o ferro (CLYDESDALE, 1983). Dessa forma, a estrutura da molécula do fitato proporciona um forte potencial quelante e faz com que ela se ligue ionicamente a cátions mono e bivalentes, incluindo certos minerais essenciais provenientes da dieta, tornando-os biologicamente indisponíveis para absorção (STANLEY e AGUILERA, 1985). Pratley et al., 1982, citados por STANLEY e AGUILERA (1985), demonstraram que, em pH fisiológico, complexos solúveis proteína-cálcio-fitato foram produzidos e que o cálcio foi requerido para a associação de proteína com fitato.

Estudos *in vitro* têm mostrado que complexos de ácido fítico com minerais são insolúveis no pH intestinal e biologicamente indisponíveis para absorção. Assim, a formação destes complexos é pH dependente. Também, quando dois ou mais cátions estão presentes, um pode agir sinergisticamente, aumentando a precipitação de sais de fitato (ERDMAN, 1979).

Entre os métodos de processamento, germinação e fermentação parecem ser os mais eficazes na diminuição da concentração de fitato, enquanto o molho e

Quadro 8 - Conteúdo de ácido fítico de feijões inteiros e descascados^a

Cultivar	Ácido Fítico (mg/g)		% Aumentada no descascamento
	Feijões inteiros	Feijões descascados	
<i>Sanilac</i>	27,5	29,4	6,9
<i>Great Northern</i>	20,4	32,6	59,8
<i>Small White</i>	11,6	16,3	40,5
<i>Cranberry</i>	26,3	33,9	28,9
<i>Viva Pink</i>	21,6	29,1	34,7
<i>Pinto</i>	23,8	25,6	7,6
<i>Light Red kidney</i>	26,3	34,7	31,9
<i>Dark Red kidney</i>	28,6	36,7	28,3
<i>Small Red</i>	20,7	30,5	47,3
<i>Black Beauty</i>	29,3	36,1	23,2

^a Média de determinações triplicadas em base seca.
 Fonte: DESHPANDE et al. (1982).

cozimento podem remover 50 a 80% ou mais do fitato endógeno em grãos de feijões (Sathe e Salunke, 1985, citados por REYES-MORENO e PAREDES-LOPEZ, 1993).

O aumento no conteúdo de ácido fítico dos feijões com o descascamento (Quadro 8) pode ser atribuído ao processo empregado. Visto que o revestimento da semente foi removido manualmente, algumas mudanças foram esperadas na composição das camadas de aleurona dos feijões. Conseqüentemente, a perda de ácido fítico através da remoção de cascas seria mínima. Se os feijões secos fossem mecanicamente moídos, mudanças substanciais seriam esperadas no conteúdo de ácido fítico através da remoção das camadas de aleurona. Grandes

perdas, de 15 a 25% do peso seco da semente, têm sido relatadas durante a moagem mecânica dos feijões secos (DESHPANDE et al., 1982).

2.3.5. Inibidores de α -amilase

Os inibidores de α -amilase estão presentes na maioria das leguminosas, embora suas funções fisiológicas e sua significância nutricional estejam ainda sob estudo (GEIL e ANDERSON, 1994). JAFFÉ et al. (1973) encontraram a presença de atividade inibitória de α -amilase em 79 dos 95 cultivares de leguminosas testadas.

É difícil comparar as atividades inibitórias de enzimas de feijões, principalmente por causa das diferenças nos métodos usados. MARSHALL e LAUDA (1975) relataram uma variação de 2.850 a 6.680 unidades/g de feijão para inibidores de α -amilase de oito cultivares de *Phaseolus vulgaris*. A faixa para atividades inibitórias da α -amilase, para os cultivares, foi de 330 a 675 unidades/g de feijão inteiro.

Os inibidores de amilase do feijão inibem α -amilase de larvas de insetos (SGARBIERI e WHITAKER, 1981), mas não são ativos contra as α - ou β -amilases do feijão (JAFFÉ et al., 1973; POWERS e WHITAKER, 1977). Com base nisto, tem sido proposto que o papel fisiológico do inibidor de α -amilase em feijão é o de proteger a semente contra ataque de insetos (SGARBIERI e WHITAKER, 1981). Além disso, os inibidores de α -amilase de feijão são capazes de inibir a α -amilase da saliva humana e a α -amilase pancreática suína, mas não a de plantas superiores e de α -amilases microbianas (SGARBIERI e WHITAKER, 1981).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios dos Departamentos de Tecnologia de Alimentos e de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa - MG.

Feijão (*Phaseolus vulgaris*) preto adquirido no comércio local foi utilizado em todas as etapas do trabalho.

O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira foram identificadas as estruturas químicas de antocianinas do feijão; a etapa seguinte consistiu de ensaios biológicos. Foram testados os efeitos da retirada parcial do tegumento e da extração de parte dos pigmentos e outros polifenóis na qualidade protéica do feijão.

3.1. Identificação das antocianinas presentes no feijão

3.1.1. Escolha do solvente extrator

Segundo STRACK e WRAY (1989), a extração de antocianinas é comumente acompanhada pela maceração da parte vegetal com metanol ou etanol acidificado com HCl (0,1 a 1,0%).

Com o objetivo de avaliar qual o melhor solvente para extração das antocianinas presentes na amostra, foram utilizados metanol e etanol 70%, ambos acidificados com 0,5% de HCl.

Foi verificada a eficiência dos dois solventes extratores na remoção de antocianinas a partir de grãos inteiros e triturados.

3.1.2. Preparação do extrato

Um quilograma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi macerado com etanol 70% acidificado com 0,5% de HCl. Utilizou-se um volume do solvente suficiente para cobrir todo o material sólido. A maceração foi realizada durante 24 horas, a 5°C, ao abrigo da luz. Após este tempo, procedeu-se à filtração através de pano fino. O extrato assim obtido foi centrifugado a 666,0 Fg (2.000 rpm) por dez minutos, utilizando-se uma centrífuga modelo Universal UV, da Internacional Equipamento (IEC), e, a seguir, filtrado em papel Whatman nº 1, através de funil de Buchner. Após a filtração, extraiu-se a clorofila presente no extrato com porções de 10 ml da mistura éter etílico-éter de petróleo (1:1). A seguir, procedeu-se à concentração do extrato, sob pressão reduzida, a uma temperatura de 35 a 40°C, com evaporador rotatório modelo 802, da Fisaton Equipamentos Científicos Ltda., acoplado à bomba de vácuo marca Tecnal, da Marconi S.A., modelo TE 053.

O extrato concentrado foi armazenado sob nitrogênio, ao abrigo da luz, a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$, para utilização nas etapas seguintes.

O pH do extrato inicial foi de 1,8 e, após concentração, de 0,7.

3.1.3. Condições para separação das frações de antocianinas

O extrato concentrado, obtido em 3.1.2., foi submetido a cromatografia descendente em papel Whatman nº2 e cromatografia em camada fina em cromatoplas DC - Fertigplatten Celulose F, da Merck, com 20x20 cm e espessura de 0,1 mm.

Para escolha da fase móvel mais eficiente na separação das frações de antocianinas do feijão, foram avaliadas diversas misturas de solventes. Algumas

destas misturas são apresentadas no Quadro 9. As proporções de cada solvente foram testadas baseando-se na necessidade de aumentar ou diminuir a polaridade da fase móvel para se obter uma maior separação entre as frações de antocianinas presentes.

3.1.4. Cromatografia em papel

A partir do estudo das melhores condições para purificação descrito em 3.1.3., foi selecionada a cromatografia descendente em papel Whatman nº 2 e, como fase móvel, a mistura n-butanol:ácido fórmico:água, BFW (15:2,5:2,4).

A cromatografia foi realizada em cubas de 70x70 cm, durante sete dias.

3.1.5. Purificação das frações

Das seis zonas de coloração, as três que apresentavam maior intensidade de cor e maior área foram extraídas com metanol acidificado com 0,05% de HCl 1,5N.

A pureza das três frações, denominadas F1, F2 e F3, foi avaliada por cromatografia em papel Whatman nº1 desenvolvida em AWH (ácido acético - água - HCl, 15:82:3) e HPLC em fase reversa, descrita posteriormente.

3.1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

3.1.6.1. Preparação das amostras e dos reagentes

As soluções metanólicas das frações purificadas foram concentradas, a vácuo, em evaporador rotatório até a secura, à temperatura de 38°C, ao abrigo da luz, e, posteriormente, foram redissolvidas em metanol:água:ácido clorídrico (50:50:1). As soluções resultantes foram filtradas em membrana FH 1.300, Millipore, com diâmetro do poro de 0,45 µ, e imediatamente injetadas no sistema HPLC.

Todos os reagentes empregados na fase móvel foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo e, a seguir, desgaseificados em sistema de ultra-som.

Quadro 9 - Misturas de solventes avaliadas como fase móvel em cromatografia de camada fina e papel, para separação de antocianinas de feijão

Misturas	Proporções					
	N - butanol	ác. fórmico	ác. acético	HCl	benzeno	água
1	3	-	3	-	-	3
2	-	50	-	-	-	50
3	-	-	7,5	1,5	-	41
4	6	-	1	-	-	12
5	20	-	-	-	7,5	5,7
6	-	-	-	3	-	97
7	-	10	-	1	-	3
8	4	-	1	-	-	2
9	-	-	30	3	-	10
10	12	-	3	-	-	5
11	15	25	-	-	-	24
12	2,5	3,5	-	-	-	2,4
13	1,5	1,5	-	-	-	2,4
14	2,5	2,5	-	-	-	2,4
15	-	2,5	-	-	2,0	2,4
16	-	5	-	1	-	3
17	4	-	4	-	-	3
18	3	-	3	-	-	3
19	2,5	3,5	-	-	-	2,4
20	15	2,5	-	-	-	2,4

3.1.6.2. Análise por HPLC

As zonas purificadas foram submetidas à análise por HPLC, seguindo-se metodologia descrita por GUEDES (1993), com algumas alterações. Utilizou-se cromatógrafo líquido de alto desempenho, modelo CG-480, com injetor Rheodyne 7125 e “loop” de 100µl. Na separação isocrática, o volume injetado foi de 10µl, medidos em seringa Hamilton de 100µl. A coluna utilizada foi RP-18 Bondapack, 300 x 4 mm. A fase móvel foi constituída de metanol:água:ácido clorídrico (50:50:1). A detecção foi feita pela absorvância a 530 nm, utilizando-se detector espectrofotométrico UV-visível, modelo Varian UV-50, utilizando-se o integrador-processador modelo CG-200 (CG Inst. Científicos).

3.1.7. Reações específicas de antocianinas

Após concentração a vácuo a 35-40°C, em evaporador rotatório, alíquotas das frações eluídas do papel foram recromatografadas utilizando-se ácido acético 10% como fase móvel, durante 12 horas. Após secagem, os cromatogramas foram expostos aos vapores de hidróxido de amônio, para verificar a ausência de flavonóides não-antociânicos.

A reação com NH₃ foi realizada submetendo-se o papel, contendo o pigmento em estudo, aos vapores de NH₃ durante três minutos, segundo preconizado por HARBORNE (1967).

As três frações obtidas foram analisadas por espectrofotometria em espectrofotômetro marca HITACHI U-2000 Double-Beam, para obtenção de espectros de absorção UV-visível. Foram obtidos os espectros de cada uma das frações, assim como do extrato bruto de feijão, entre os comprimentos de onda de 200 a 600 nm, utilizando metanol acidificado, com 0,01% de HCl concentrado, como solvente.

A reação das antocianinas com cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5%, em metanol, foi realizada conforme técnica descrita por GEISSAN et al. (1953), para verificação da existência de hidroxila vicinal.

3.1.8. Hidrólise ácida das frações purificadas

Com o objetivo de identificar os açúcares e as antocianidinas, as frações purificadas foram submetidas à hidrólise ácida.

A 1 ml de cada uma das soluções das frações purificadas, colocadas em tubos de ensaio, foram adicionados 2 ml de metanol e 2 ml de HCl 2N. As soluções resultantes foram levadas a banho-maria, à temperatura de ebulição, por 75 minutos. Após resfriamento, as agliconas foram extraídas com 1 ml de álcool isso-amílico, de acordo com método descrito por DU e FRANCIS (1973).

3.1.8.1. Identificação das antocianidinas

As soluções contendo as agliconas (item 3.1.8) foram concentradas a vácuo, em evaporador rotatório, à temperatura de aproximadamente 38°C, e a seguir ressolubilizadas em metanol. Estas soluções foram submetidas a cromatografia descendente em papel Whatman nº1, com as seguintes fases móveis: n-butanol : ácido acético : água (BAW) (4:1:5), ácido acético : ácido clorídrico : água (Forestal) (30:3:10) e ácido fórmico : ácido clorídrico : água (Fórmico) (5:2:3). Os valores de Rf foram determinados e comparados com valores fornecidos pela literatura (HARBORNE, 1967).

3.1.8.2. Identificação dos açúcares

Utilizou-se cromatografia em papel Whatman nº 1 e placa de celulose das amostras obtidas após hidrólise das frações e dos padrões de açúcares mais comumente encontrados em antocianinas. A fase móvel consistiu de butanol:ácido acético:água (12:3:3). A cromatografia foi desenvolvida durante 12 horas. Depois de seco, o papel foi submetido a revelação. A solução reveladora aplicada por meio de borrifador consistiu de mistura, no momento de uso, de partes iguais de soluções A e B.

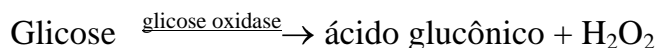
Solução A: anilina:acetona (1,3:50)

Solução B: ácido fosfórico:ácido acético:acetona (0,6:20:30).

Após secagem e aquecimento a 105°C, durante dois a cinco minutos, ocorreu o aparecimento de manchas coloridas no papel. A identificação dos açúcares foi feita por comparação dos Rfs das frações com os padrões.

A reação específica da glicose com a glicose oxidase foi possível através da utilização de kit da *Biolab* e aparelho *Clinline 150* da *BioMérieux*.

A determinação enzimática da glicose ocorre através das seguintes reações e posterior leitura a 505 nm.



3.1.9. Hidrólise ácida controlada

As hidrólises controladas das soluções metanólicas das frações purificadas (item 3.1.5) foram realizadas segundo método descrito por FRANCIS e HARBORNE (1966).

Alíquotas das soluções hidrolisadas foram retiradas com 0, 4, 6, 8, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 75 minutos de reação e submetidas a cromatografia descendente em papel Whatman nº1, desenvolvidas em AWH (15:82:3).

3.1.10. Preparo da solução de delphinidina de berinjela

Tendo sido identificada como delphinidina uma das frações de antocianinas do feijão e tendo conhecimento de que esta mesma antocianina está presente em berinjela (GUEDES, 1993), utilizou-se HPLC para confirmação da identificação dessa fração do feijão.

O extrato bruto de berinjela obtido seguindo o mesmo procedimento descrito para o feijão foi submetido a cromatografia descendente em papel tipo mata-borrão, sendo a fase móvel HCl 1%, por 24 horas. A fração 1, maior fração, foi eluída e recromatografada em BAW (6:1:2). A zona com maior teor de pigmentos por exame visual foi recromatografada em HAc 10%. Foi eluída, em metanol, a zona com maior intensidade de cor (GUEDES, 1993).

3.1.11. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As soluções metanólicas das zonas purificadas foram concentradas, a vácuo, em evaporador rotatório, até a secura, à temperatura de 38°C, ao abrigo da luz, e, posteriormente, foram redissolvidas em água deuterada (D₂O), para

obtenção dos espectros de RMN a 400 MHz, no aparelho BRUKER WM 400, na Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2. Avaliação da qualidade protéica do feijão

Foram realizados dois ensaios biológicos. O primeiro deles com o objetivo de avaliar a interferência do tegumento dos grãos e o outro, a influência dos pigmentos do feijão na qualidade protéica deste alimento.

3.2.1. Efeito da retirada do tegumento na qualidade protéica

3.2.1.1. Preparo das dietas

Para este ensaio foi preparada uma ração aprotéica e outras três rações cujas fontes protéicas foram: feijão, feijão sem tegumento e caseína.

No preparo das rações à base de feijão, primeiramente os grãos foram limpos e lavados. Então, adicionou-se água na proporção de 3:1 e procedeu-se à cocção em panela de pressão por 45 minutos. O feijão cozido foi utilizado no preparo de uma das rações.

Para a retirada dos tegumentos, o feijão, após ter sido cozido, foi passado em peneira. Os tegumentos extraídos foram novamente fervidos por cerca de dois minutos, para que se desprendesse parte do cotilédone que se apresentava aderida ao tegumento, e, a seguir, coados. O caldo foi adicionado à porção constituída pelos cotilédones.

Os preparados foram secos em estufa a 60°C, com ar forçado, por 24 horas, com posterior moagem. Então, procedeu-se à análise de nitrogênio, pelo método semimicro Kjeldahl, para determinação do teor de proteína, usando-se o fator 6,25 (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1970).

Baseando-se nas necessidades nutricionais dos ratos utilizados no experimento, segundo NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1972), procedeu-se ao preparo das rações, homogeneizando-se, através de três passagens sucessivas

por peneira, de maneira que a composição final da ração estivesse de acordo com a composição a seguir:

- Proteína: 9,0 a 10,0 %
- Mistura salina: 3,5%
- Mistura vitamínica: 1,0%
- Cloreto de Colina: 0,2%
- Gordura (óleo de soja): 5,0%
- Amido q. s. p. 100%.

As misturas vitamínica e salina são apresentadas nos Quadros 10 e 11.

Após esse procedimento, foi feita análise quantitativa de proteínas nas dietas experimentais, utilizando-se a mesma técnica citada anteriormente, para confirmação de seu teor.

As rações foram estocadas sob refrigeração.

3.2.1.2. Ensaio biológico

A avaliação da qualidade protéica das dietas experimentais foi realizada por meio de métodos biológicos. Para tal, utilizaram-se, para cada ensaio, 24 ratos machos, raça *Wistar*, recém-desmamados, com média de 23 dias de idade, com peso entre 50 e 60g, provenientes do biotério do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

Os animais foram divididos em quatro grupos de seis, de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse a 5 gramas, conforme recomendação da ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (1975), e foram distribuídos em gaiolas individuais, onde receberam água e alimento *ad libitum*.

Quadro 10 - Mistura vitamínica utilizada

Vitaminas	Quantidade por kg
Tiamina HCl (B ₁)	600 mg
Riboflavina (B ₂)	600 mg
Piridoxina HCl (B ₆)	700 mg
D-pantotenato de cálcio	1,6 g

Ácido nicotínico	3,0 g
Ácido fólico	200 mg
D-biotina	20 mg
Cianocobalamina (B ₁₂)	1 mg
Retinil palmitato ou acetato (A)	6 g
DL-alfa tocoferol acetato (E)	5 g
Colecalciferol (D)	2,5 mg
Menaquinona (K)	5,0 mg
Amido	q.s.p.

Fonte: AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977).

Quadro 11 - Mistura salínica utilizada

Sais	g/kg
Fosfato de cálcio dibásico (CaHPO ₄)	500
Cloreto de sódio	74
Citrato de potássio monohidratado	220
Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄)	52
Óxido de Magnésio (MgO)	24
Carbonato manganoso 43-48% Mn	3,5
Sulfato manganoso	4,0
Citrato férrico 16-17% Fe	6,0
Carbonato de zinco 70% ZnO	1,6
Carbonato cúprico 53-55% Cu	0,3
Iodato de potássio (KIO ₃)	0,01
Selenito de sódio (Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O)	0,01
Sulfato de cromo e potássio [CrK(SO ₄) ₂ . 12H ₂ O]	0,55
Amido	q.s.p.

Fonte: AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977).

Os grupos foram distribuídos de acordo com a fonte protéica, como descrito a seguir:

- grupo 1: dieta aprotéica;
- grupo 2: caseína;
- grupo 3: feijão integral; e
- grupo 4: feijão sem tegumento.

Durante um período de 28 dias, os animais foram monitorados, semanalmente, quanto ao ganho de peso e consumo alimentar.

3.2.1.3. Análise dos resultados

a) O PER (Coeficiente de Eficácia Protéica) foi determinado no 28^o dia pela relação entre o ganho de peso e o consumo protéico, conforme descrito pela ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (1975).

$$\text{PER} = \text{ganho de peso (g)} / \text{consumo protéico (g)}$$

b) O NPR (Quociente de Eficiência Líquida Protéica ou Razão Protéica Líquida) foi determinado no 14^o dia do experimento, tomando-se o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo de dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, de acordo com metodologia descrita por BENDER e DOELL (1957).

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo-teste} + \text{perda de peso (g) do grupo aprotéico}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo-teste}}$$

3.2.2. Efeito da extração de pigmentos na qualidade protéica

3.2.2.1. Preparo das dietas

Para este ensaio foram preparados quatro tipos de rações. Uma à base de feijão previamente submetido à extração de pigmentos, com etanol 70% acidificado com 0,5% de HCl; outra com feijão integral (sem tratamento); uma cuja fonte protéica foi a caseína; e uma aprotéica.

No preparo das rações à base de feijão, primeiramente, o feijão foi limpo e lavado. Então, adicionou-se etanol acidificado na proporção 2:1 (etanol:feijão), para extração de pigmentos e outros polifenóis. O etanol foi drenado e o material submetido novamente à extração. Este tratamento foi repetido por várias vezes, até que o líquido drenado apresentasse pouca pigmentação.

O feijão parcialmente despigmentado foi seco em estufa a 60°C, com ar forçado, por 24 horas. Em seguida, foi submetido a cocção em autoclave, por 45 minutos, assim como o feijão integral. A seguir, procedeu-se à secagem do material (feijão + caldo de cocção) em estufa, a 60°C, com ar forçado, por 24 horas, e posterior moagem.

Após esse procedimento, foi feita a análise de nitrogênio, pelo método semimicro Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1970), do feijão despigmentado e do feijão integral, para determinação do teor de proteína. Foi utilizado o fator 6,25 para conversão de N em proteína.

Baseando-se nas necessidades nutricionais dos ratos utilizados no experimento, segundo NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1972), procedeu-se ao preparo das rações, homogeneizando-se, através de três passagens sucessivas por peneira, de maneira que a composição final da ração estivesse de acordo com a composição já citada no item 3.2.1.1.

Após esse procedimento, foi feita determinação quantitativa de proteínas das dietas experimentais, como descrito anteriormente, para confirmação de seu teor.

As rações foram estocadas sob refrigeração.

3.2.2.2. Ensaio biológico

A avaliação da qualidade protéica das dietas experimentais foi realizada como descrito para o ensaio anterior (3.2.1.2.), porém com 14 dias de duração.

Os grupos foram distribuídos de acordo com a fonte protéica, como descrito a seguir:

- grupo 1: dieta aprotéica;
- grupo 2: caseína;
- grupo 3: feijão integral; e
- grupo 4: feijão submetido a tratamento com etanol acidificado.

3.2.2.3. Análise dos resultados

O Coeficiente de Eficácia Protéica (PER) e o Quociente de Eficiência Líquida Protéica (NPR) foram determinados no 14^o dia, como descrito em 3.2.1.3.

Com relação ao NPU (Utilização Líquida da Proteína), a determinação foi feita pelo método da carcaça, segundo MILLER e BENDER (1955). Os animais foram sacrificados, no 14^o dia, em dessecador contendo éter etílico. Em seguida, foram seccionados e as carcaças colocadas em recipientes de alumínio, para secar. Após o período de 24 horas de secagem em estufa a 105°C, com ar forçado, as carcaças foram resfriadas, pesadas, trituradas e desengorduradas em extrator Soxhlet, durante quatro a cinco horas, com éter de petróleo, e pulverizadas em multiprocessador. Para determinação do teor de nitrogênio retido na carcaça, utilizou-se o método semimicro Kjeldahl, com amostras em triplicata, dada pela equação:

$$\text{NPU} = \frac{\text{B} - \text{BK}}{\text{I}} \times 100$$

em que B = nitrogênio corporal dos animais em dieta-teste;

BK = nitrogênio corporal dos animais em dieta aprotéica; e

I = nitrogênio ingerido pelo grupo-teste.

Para determinação da digestibilidade, foram colhidas fezes em sua totalidade, do 8^o ao 14^o dia do experimento. As dietas foram marcadas com carmim (200 mg/100 g) e oferecidas aos animais no 7^o e no 13^o dia. As fezes colhidas foram acondicionadas em recipientes individuais para cada rato e mantidas sob refrigeração. Findo o período de colheita, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar mecânica, a 105°C, por 24 horas. Depois, foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador para posterior determinação do teor de nitrogênio, pelo método semimicro Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1970).

A digestibilidade foi expressa em porcentagem, conforme recomendação da NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1972). O cálculo foi feito, de acordo com a seguinte fórmula:

$$D = \frac{I - [(F - FK)]}{I} \times 100$$

em que I = nitrogênio ingerido pelo grupo-teste;

F = nitrogênio fecal do grupo-teste; e

FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

3.2.3. Análise de polifenóis

Para extração e doseamento dos compostos fenólicos, foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Denis (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1960; SWAIN e HILLIS, 1959).

4. RESULTADOS

4.1. Escolha do solvente extrator

Como visto na literatura, o primeiro passo na identificação das antocianinas individuais é a preparação de um extrato de pigmento bruto. Para materiais vegetais existe um solvente-padrão para todas as amostras, que é uma solução de metanol com HCl a 0,5%. Contudo, quando se tratar de corantes para alimentos, a solução de etanol pode ser mais indicada, devido à toxicidade do metanol, embora o etanol seja levemente menos efetivo na extração (FRANCIS, 1982).

Os dois solventes testados, etanol 70% e metanol, acidificados com 0,5% de HCl, apresentaram resultados equivalentes quanto à extração de antocianinas. Dessa forma, optou-se pela utilização de etanol, uma vez que o metanol, por ser um solvente tóxico, apresenta maior dificuldade de manuseio.

Quanto à influência da trituração dos grãos na extração de antocianinas de feijão, observou-se que, quando a amostra era triturada, resultava em maior eficiência de extração dos pigmentos. No entanto, a etapa de filtração da solução resultante da extração a partir dos grãos triturados foi dificultada pela obstrução dos poros do papel- filtro. Uma vez que o objetivo desta etapa do trabalho era a

extração das antocianinas e não a sua quantificação, optou-se pela utilização dos grãos inteiros.

4.2. Escolha da fase móvel para purificação do extrato

Na separação de antocianinas do feijão, tanto para cromatografia em camada fina quanto para cromatografia em papel, diversas misturas de solventes foram avaliadas como fase móvel.

Para cromatografia em camada fina, utilizando placas de celulose, a melhor fase móvel para separação das diferentes antocianinas do feijão foi n-butanol : ácido fórmico : água (2,5:3,5:2,4). Outras misturas de solventes que também apresentaram eficiência na separação das frações foram ácido fórmico : ácido clorídrico : água (10:1:3) e n-butanol : ácido acético : água (4:1:2).

A cromatografia descendente, em papel, é o método de escolha quando se deseja obter maior volume de cada fração de antocianina separada. Para esse tipo de cromatografia, dentre as misturas de solventes avaliadas, a mistura n-butanol : ácido fórmico : água, denominada BFW, na proporção 15:2,5:2,4, possibilitou a melhor separação das frações de antocianinas. Esta foi a fase móvel escolhida para realização da etapa seguinte.

4.3. Purificação das frações de antocianinas

Normalmente, as plantas apresentam misturas de antocianinas, e, conseqüentemente, sua separação e purificação apresentam dificuldades quando se utiliza cromatografia em papel, placa ou coluna (WROLSTAD e STRUTHERS, 1971).

O extrato bruto foi submetido a cromatografia descendente em papel Whatman nº2, durante sete dias, utilizando BFW (15:2,5:2,4) como fase móvel.

Das seis bandas distintas que puderam ser visualizadas nos cromatogramas obtidos, as três que apresentaram maior intensidade de cor e que, portanto, se encontravam em maior proporção no extrato foram denominadas F1, F2 e F3 (Figura 3).

Essas frações foram recortadas do cromatograma e extraídas em metanol acidificado com 0,05% de HCl 1,5N.

A seguir, com o objetivo de detectar a presença de flavonóides não-antociânicos, alíquotas de cada uma das frações e o extrato bruto foram aplicados em papel Whatman nº 1 e submetidas a cromatografia descendente, durante 12 horas, tendo ácido acético 10% como fase móvel. O cromatograma foi, então, submetido a vapores de hidróxido de amônio. Não foi detectada a presença de coloração amarela característica destes flavonóides nas frações purificadas. No entanto, a presença desses compostos no extrato bruto foi facilmente visualizada pelo aparecimento de zonas de coloração amarelada localizadas tanto próximo à origem quanto em frente do solvente (Figura 4).

Ainda com o objetivo de confirmar a pureza de cada uma das três frações, alíquotas das mesmas foram submetidas a cromatografia em papel, desta vez utilizando-se AWH (ácido acético:água:HCl, 15:82:3) como fase móvel. Os cromatogramas apresentaram uma única banda, correspondente a cada uma das frações purificadas.

Para monitoramento da purificação, espectros de absorção UV-visível do extrato bruto e das frações F1, F2 e F3, diluídas em metanol acidificado com 0,05% de HCl 1,5N, foram obtidos, utilizando-se um espectrofotômetro marca HITACHI-2000 Double-Beam. Estes espectros são mostrados na Figura 5.

A eficiência da separação e purificação das frações por cromatografia em papel pode ser constatada pela diminuição da razão $A_{\max \text{ UV}}/A_{\max \text{ VIS}}$ do extrato bruto, em relação às zonas purificadas, evidenciando a retirada de flavonóides e ácidos livres que absorvem na região do ultravioleta (Quadro 12) (HARBORNE, 1967).

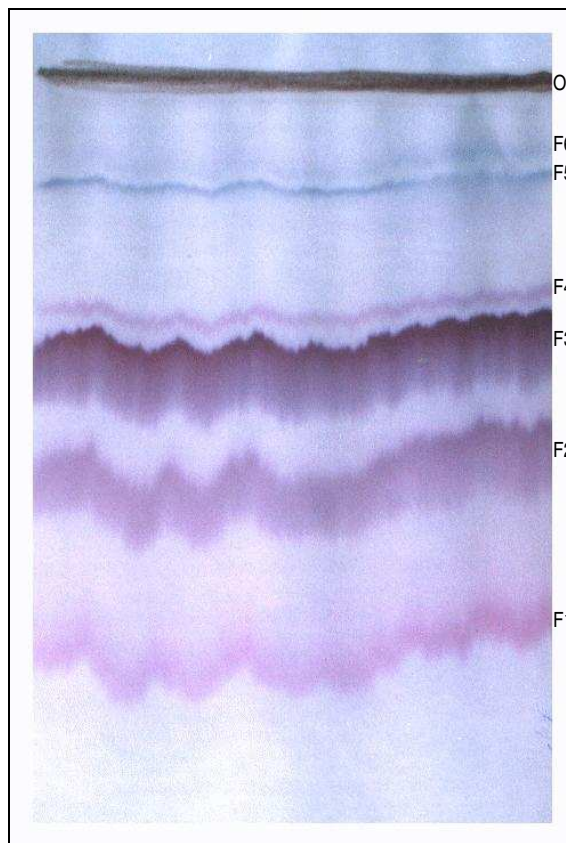


Figura 3 - Cromatograma do extrato bruto de feijão em BFW (15:2,5:2,4).
O = origem.

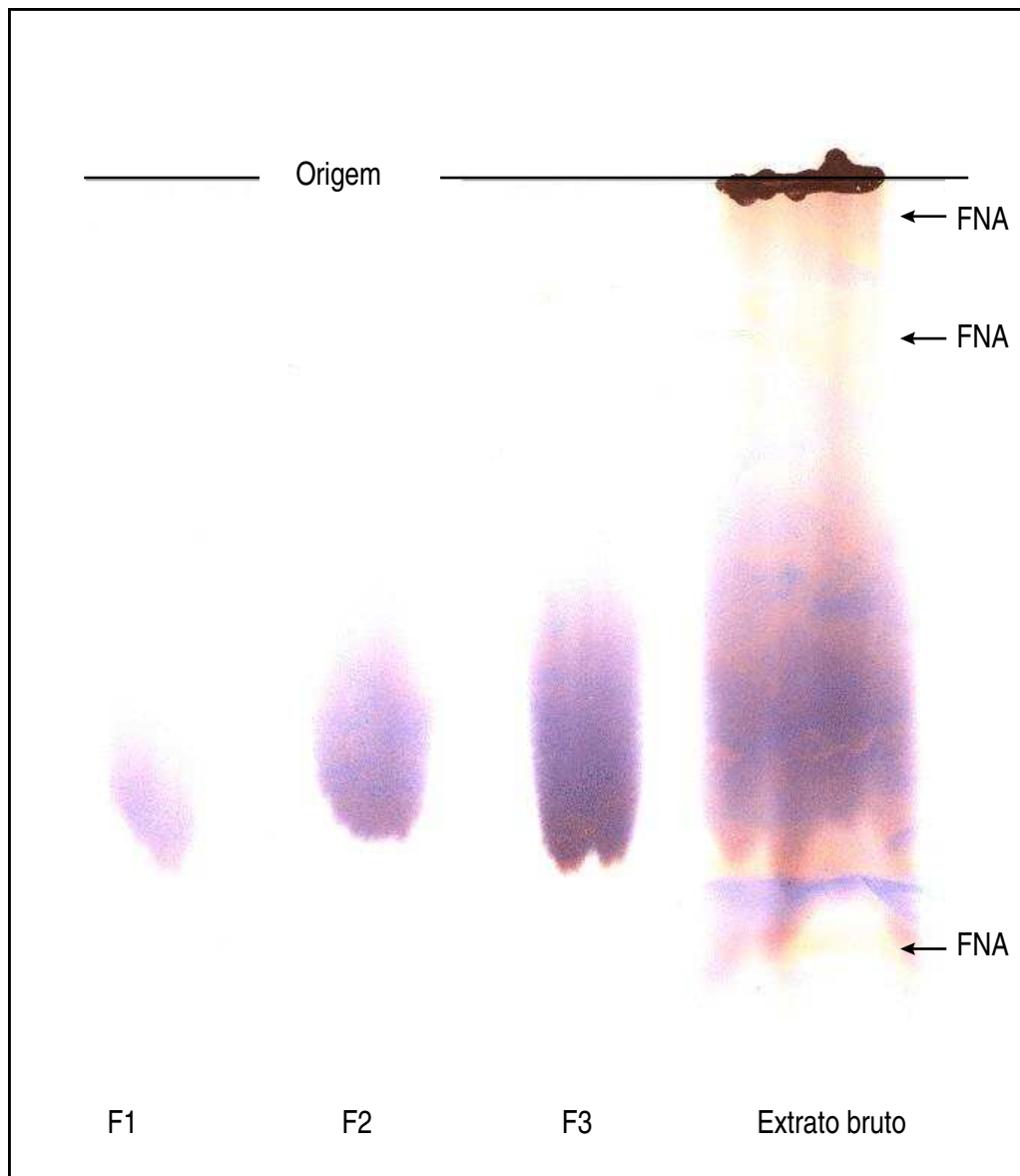


Figura 4 - Cromatograma em papel, utilizando-se ácido acético 10% como fase móvel, das frações purificadas e do extrato bruto. FNA = flavonóides não-antociânicos.

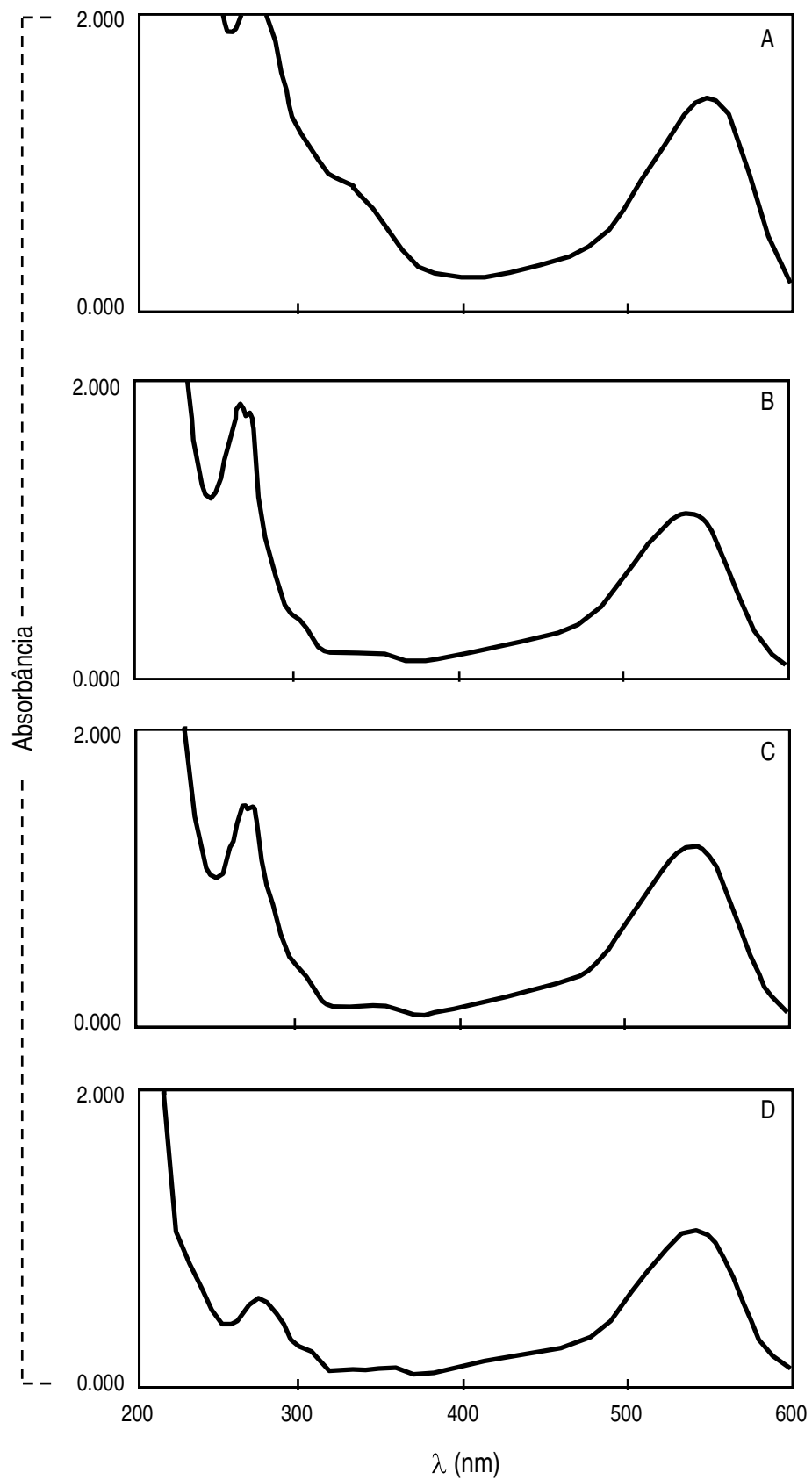


Figura 5 - Espectros de absorção UV-visível do extrato bruto (A), da fração 1 (B), da fração 2 (C) e da fração 3 (D) em metanol acidificado com 0,05% de HCl 1,5N.

Quadro 12 - Efeito da purificação das frações na razão $A_{\max \text{ UV}}/A_{\max \text{ VIS}}$

	$A_{\max \text{ UV}}$	$A_{\max \text{ VIS}}$	$A_{\max \text{ UV}}/A_{\max \text{ VIS}}$
Extrato bruto	2,164	1,414	1,530
Fração 1	1,810	1,069	1,693
Fração 2	1,494	1,192	1,253
Fração 3	0,585	1,005	0,582

Os cromatogramas obtidos por HPLC, com seus respectivos tempos de retenção, serviram para comprovar a eficiência na purificação das frações. Observou-se que os cromatogramas das frações F1, F2 e F3 apresentaram apenas um pico (Figura 6). Isto indica que a purificação em cromatografia em papel utilizada é uma técnica que permite a purificação do pigmento extraído, conforme preconizado por FULEKI (1971) e GUEDES (1993).

4.4. Identificação da estrutura dos pigmentos purificados

Os espectros de absorção após a reação com AlCl_3 (Figura 7) mostram os deslocamentos batocrômicos nas frações 2 e 3, o que comprova a presença de hidroxilas vicinais nas moléculas de antocianinas destas frações. Comparando os espectros de absorção da fração 1, antes e após reação com AlCl_3 , verifica-se que não houve deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção. Isto indica a ausência de grupos orto-dihidroxílicos no anel B da antocianina.

As antocianinas que apresentam reação positiva com cloreto de alumínio com deslocamento batocrômico de 13 a 25 nm, dependendo do pH do meio,

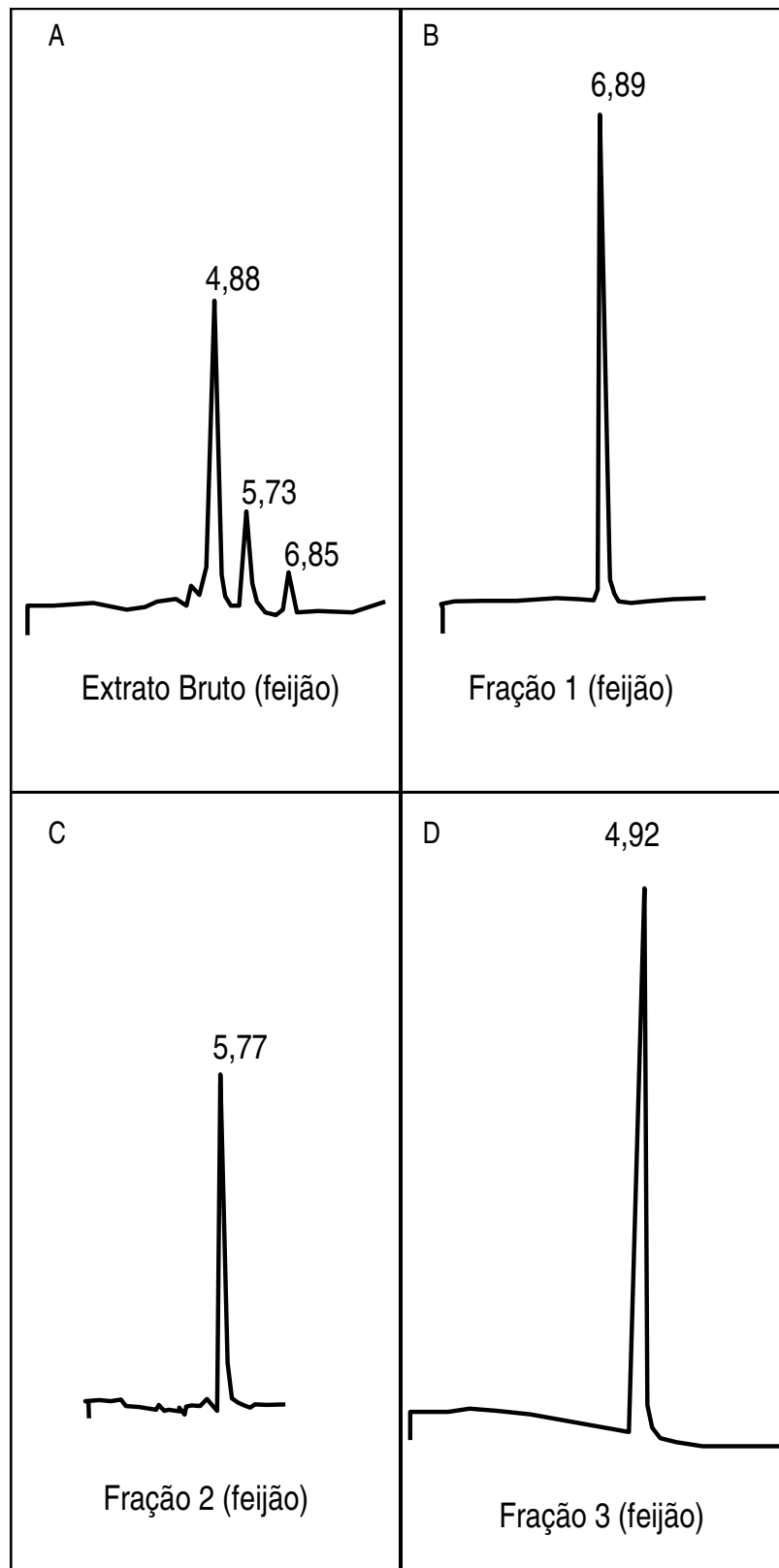


Figura 6 - Cromatogramas do extrato bruto (A), da fração 1 (B), da fração 2 (C) e da fração 3 (D). Condições: coluna RP-18 Bondapack, fase móvel constituída de metanol:água:HCl (50:50:1), fluxo de 0,6 ml/min e detector UV/VIS 530 nm.

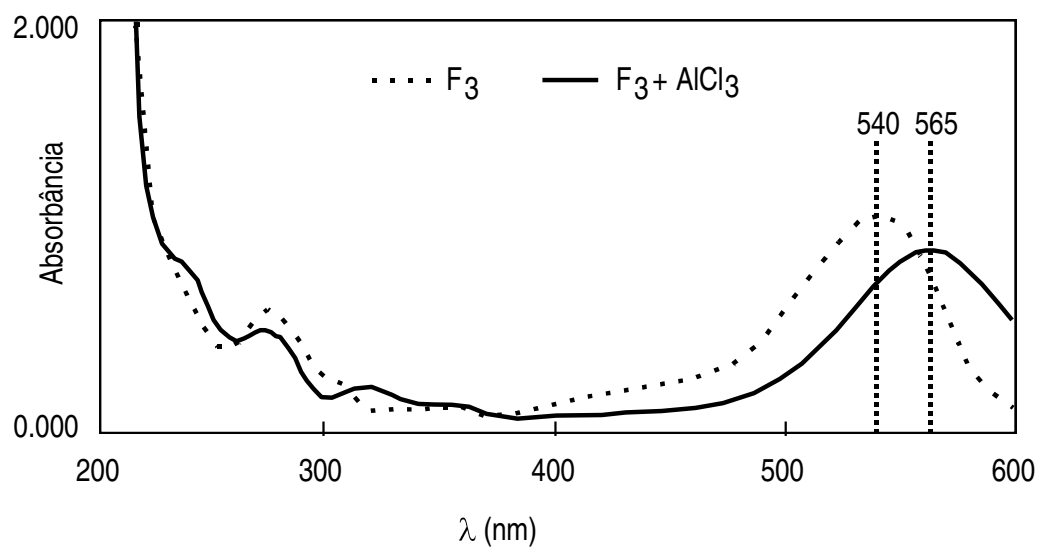
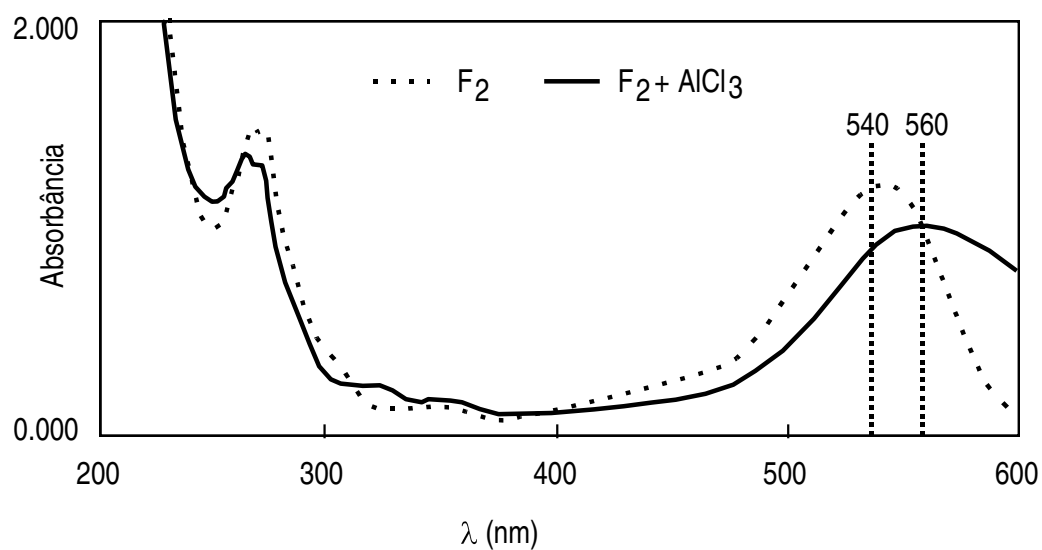
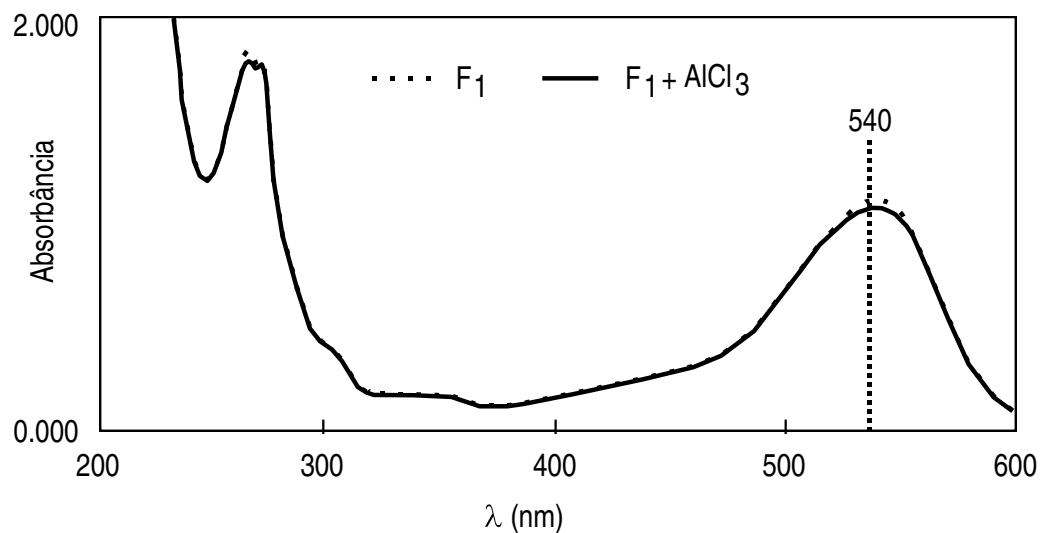


Figura 7 - Espectros de absorção UV-Visível das frações 1, 2 e 3 antes e após a reação com AlCl₃.

possuem em sua estrutura grupos orto-dihidroxílicos no anel B, como é o caso das cianidinas e delfinidinas (HARBORNE, 1964).

De acordo com SHRIKHLANDE e FRANCIS (1974), a ausência de picos de absorção a 286 nm e 334 nm indica a ausência de ácido na molécula de antocianina. Como pode ser observado na Figura 5, nenhuma das frações apresentou picos de absorção nestes comprimentos de onda, o que sugere a ausência de ácido nas antocianinas purificadas.

Basicamente, antocianidinas são identificadas pela observação de sua cor em solução ou no papel, seu Rf em solvente Forestal e suas propriedades espectrais (HARBORNE, 1967).

Com o solvente ácido fórmico obtêm-se valores de Rf similares aos valores obtidos com Forestal, porém são usados adicionalmente, porque é melhor para separação de agliconas de seus glicosídeos (HARBORNE, 1967).

Butanol - ácido acético - água, se usado com papel pré-umedecido com HCl 2N, para prevenir o desaparecimento do pigmento, é um terceiro solvente (HARBORNE, 1967).

Fenol-água é usual para separação de pigmentos metilados de pigmentos não-metilados, mas não é recomendado para trabalhos de rotina (HARBORNE, 1967).

O Quadro 13 apresenta as características espectrais das antocianidinas, segundo HARBORNE (1967).

Os Quadros 14 a 16 apresentam os resultados das análises espectrofotométricas de cada uma das frações purificadas, os deslocamentos batocrômicos ($\Delta\lambda$) observados após reação com $AlCl_3$, assim como os Rfs em Forestal, BAW e Fórmico das antocianidinas obtidas após a hidrólise ácida. Estes resultados são comparados com os resultados apresentados por HARBORNE (1967) para as antocianidinas.

Os resultados obtidos com a cromatografia descendente em papel, utilizando-se BFW como fase móvel (Figura 3), e a identificação da antocianidina de cada fração (Quadros 14 a 16) estão de acordo com a Quadro 13 - Características espectrais das antocianidinas

	λ max VIS	λ max UV	$AlCl_3$ ($\Delta\lambda$)	Rf (Forestal)	Rf (Fórmico)	Rf (BAW)
Pelargonidina	476	277	0	68	33	80
Cianidina	535	277	18	49	22	68
Peonidina	532	277	0	63	30	71
Delfinidina	546	277	23	32	13	42
Petunidina	543	276	14	46	20	52
Malvidina	542	275	0	60	27	58

Fonte: HARBORNE (1967).

Quadro 14 - Características espectrais da fração 1 e citação de literatura para malvidina

	Fração 1	Malvidina *
λ max VIS	540	542
λ max UV	270	275
$AlCl_3$ ($\Delta\lambda$)	0	0
Rf (Forestal)	61,69	60
Rf (Fórmico)	25,59	27
Rf (BAW)	64,65	58

* HARBORNE (1967).

Quadro 15 - Características espectrais da fração 2 e citação de literatura para cianidina

	Fração 2	Cianidina *
λ max VIS	535	535
λ max UV	265	277
AlCl ₃ ($\Delta\lambda$)	20	18
Rf (Forestal)	48,45	49
Rf (Fórmico)	18,15	22
Rf (BAW)	64,65	68

* HARBORNE (1967).

Quadro 16 - Características espectrais da fração 3 e citação de literatura para delfinidina

	Fração 3	Delfinidina *
λ max VIS	540	546
λ max UV	275	277
AlCl ₃ ($\Delta\lambda$)	25	23
Rf (Forestal)	30,33	32
Rf (Fórmico)	13,25	13
Rf (BAW)	42	42

* HARBORNE (1967).

verificação de HARBORNE (1967), de que, quanto maior o número de grupos hidroxilas presentes na molécula de antocianina, menor o Rf, e que a presença de metilação provoca efeito inverso (Quadro 17).

Quadro 17 - Efeito da metilação e hidroxilação na mobilidade das frações de antocianinas

Fração 1	maior Rf	malvidina	2Me; 4OH
Fração 2	Rf intermediário	cianidina	5OH
Fração 3	menor Rf	delfinidina	6OH

Outra indicação de que a antocianidina da fração 3 é delfinidina é a comparação entre os tempos de retenção obtidos através de HPLC. O cromatograma obtido com a injeção da fração purificada do extrato de berinjela, cuja antocianidina, segundo a literatura, é uma delfinidina, mostra o tempo de retenção de 4,91 (Figura 8). A análise da fração 3, nas mesmas condições, apresentou tempo de retenção de 4,92.

Os açúcares de antocianinas podem ser identificados pelo procedimento usual de cromatografia em papel. A presença de glicose e galactose pode ser confirmada pelo uso de glicose e galactose oxidase, respectivamente, e a presença destes e outros monossacarídeos, pela medida do máximo “espectral” dos produtos coloridos formados depois da reação com resorcinol-H₂SO₄ ou anilina-hidrogênio fitalato (Harborne, 1960b, citado por HARBORNE, 1967).

Para identificação dos açúcares ligados às antocianidinas, alíquotas das frações foram submetidas à hidrólise ácida; a seguir, foi efetuada a separação dos

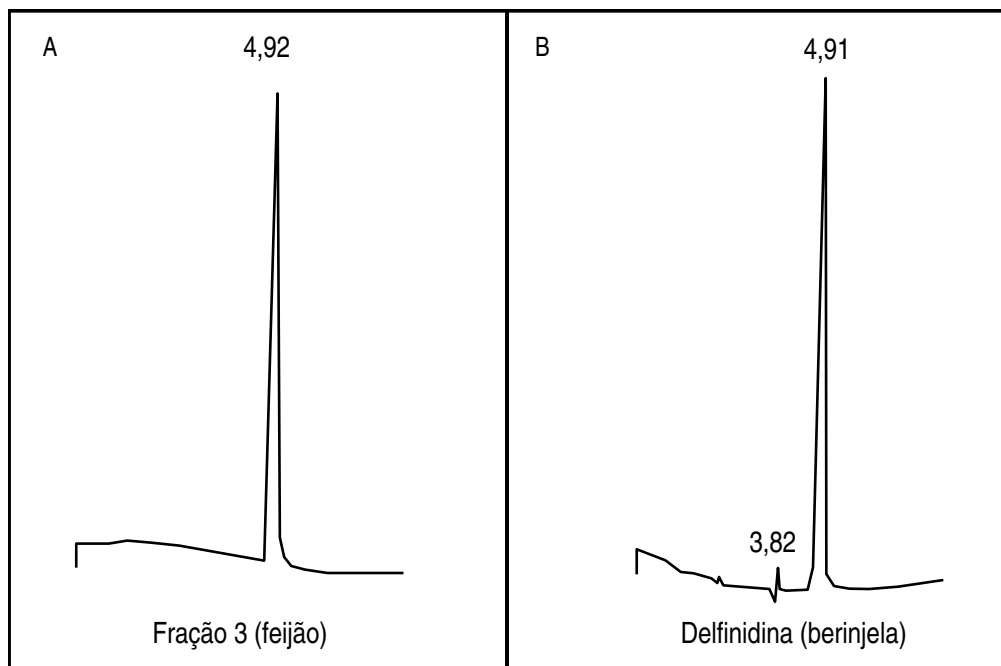


Figura 8 - Cromatogramas da fração 3 (A) e da delfinidina 3-rutinosídeo extraída de berinjela (B). Condições: coluna RP-18 Bondapack, fase móvel constituída de metanol:água:HCl (50:50:1), fluxo de 0,6 ml/min e detector UV/VIS 530 nm.

açúcares das agliconas, com utilização de álcool amílico e funil de separação. As soluções de açúcares e os padrões dos açúcares mais freqüentemente encontrados em antocianinas de alimentos foram submetidos a cromatografia em papel e placas, com objetivo de determinar seus Rfs. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 9.

Como se pode observar na Figura 9, a técnica utilizada deixava dúvidas quanto à diferenciação dos Rfs de glicose e galactose. Podia-se apenas excluir a possibilidade de serem os açúcares arabinose ou xilose.

Com o objetivo de identificar mais precisamente essas estruturas, foi utilizado método enzimático, comumente utilizado para doseamento de glicose em laboratórios de análises clínicas. Foram submetidas às análises no equipamento *Clinline 150 (BioMérieux)* amostras de solução de açúcar obtida

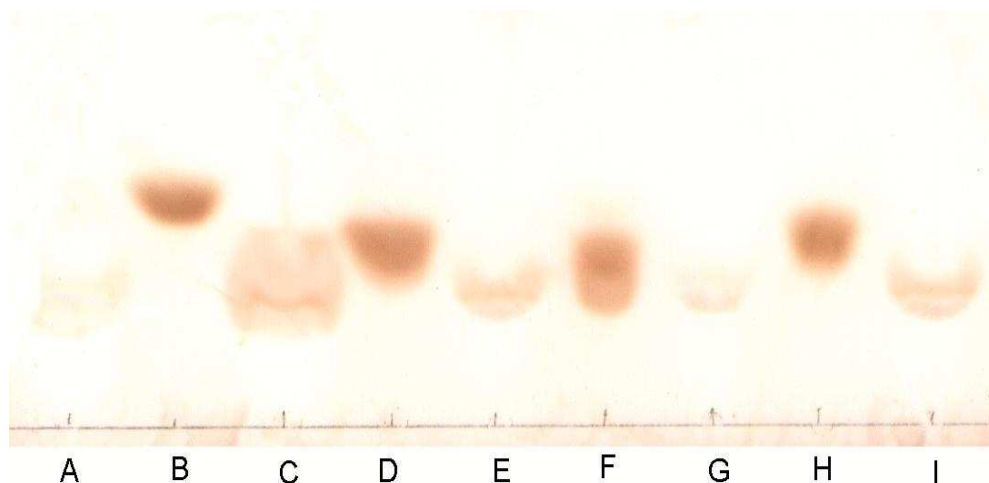


Figura 9 - Cromatograma das soluções de açúcares das frações 1, 2 e 3 e de padrões de açúcares, em placa de celulose utilizando como fase móvel butanol : ácido acético : água (12:3:3). A = F1; B = xilose; C = F2; D = glicose; E = F3; F = galactose; G = F1; H = arabinose; e I = F3.

após hidrólise ácida de cada fração e amostras de soluções-padrões de glicose e galactose. A adequação do método pôde ser avaliada pelo fato de o equipamento detectar a presença de glicose e não detectar a presença de galactose, indicando leitura zero na amostra de padrão de galactose. As análises de cada uma das amostras em estudo só foi possível após concentração das soluções a serem analisadas. Todas as três soluções de açúcares analisadas continham glicose, que foi detectada em concentrações diferentes. Pode-se, então, concluir que o açúcar presente nas moléculas de antocianinas isoladas do feijão em estudo é a glicose.

Os resultados da hidrólise controlada de alíquotas de cada uma das frações apresentaram dois produtos cujos valores dos Rf estão apresentados nos Quadros 18 a 20. O fato de serem constatados dois produtos ao longo do tempo da hidrólise ácida é indício de que os açúcares se apresentam ligados em uma única posição da molécula. Um dos produtos detectados é a antocianina na sua forma original e o outro é a antocianidina após ter sofrido hidrólise e ter a molécula de açúcar removida do carbono 3 da sua estrutura.

Quadro 18 - Valores de Rf em AWH dos produtos da hidrólise controlada da fração 1

Tempo de Hidrólise (minutos)	Rf x 100 em AWH	
	Produtos	
0		31
4		32
6		33
8		35
12		32
15		32
20		32
30	8	30
40	8	28
50	9	
60	8	
75	8	

Quadro 19 - Valores de Rf em AWH dos produtos da hidrólise controlada da fração 2

Tempo de Hidrólise (minutos)	Rf x 100 em AWH	
	Produtos	
0		24
4		25
6	6	25
8	6	26
12	7	26
15	7	25
20	9	26
30	9	26
40	9	25
50	9	26
60	9	22
75	9	22

Quadro 20 - Valores de Rf em AWH dos produtos da hidrólise controlada da fração 3

Tempo de Hidrólise (minutos)	Rf x 100 em AWH	
	Produtos	
0		22
4	5	23
6	4	22
8	7	22
12	7	22
15	6	21
20	7	21
30	7	22
40	8	21
50	8	20
60	7	19
75	7	19

A glicosilação das antocianidinas pode ocorrer nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Se um só açúcar estiver presente, ele estará sempre na posição 3 (HARBORNE, 1958a).

As glicosilações nas posições C-3, C-5 e C-7 são freqüentemente encontradas nas antocianinas, e cada substituição está associada a um deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção (HARBORNE, 1964). Cada substituição está associada a um deslocamento batocrômico, tal que a diferença no comprimento de onda de máxima absorção da antocianina 3-glicosídeo, em relação à antocianidina 3,5-diglicosídeo, tem sido utilizada como meio de sua diferenciação por técnicas espectrais (HARBORNE, 1958b).

Segundo HARBORNE (1967), as diferenças espectrais produzidas pelas antocianinas em soluções ácidas apresentam duas absorções máximas: uma na região do visível, entre 465 e 550 nm, e outra menor, na região do ultravioleta, próximo a 275 nm, com a posição da banda na região do visível variando

levemente de acordo com o solvente utilizado. O autor cita, ainda, que as antocianidinas com substituições de molécula de açúcar em C-5 produzem um ombro de curva de absorção em 440 nm, usando-se metanol em HCl 0,01%. Isto pode ser demonstrado através do cálculo da razão entre a absorção a 440 nm e a absorção máxima visível ($A_{440}/A_{\text{máx.}}$). O valor da razão da absorvância a 440 nm e no máximo de absorção no visível é indicativo da existência de açúcares nas posições 3 ou 5.

As relações percentuais entre $Abs_{440\text{nm}}/Abs_{\text{maxvis}}$ confirmam, para as frações F1, F2 e F3 (Quadro 21), que os açúcares estão ligados em C-3 das agliconas.

Os resultados de RMN não foram conclusivos, por apresentarem grande concentração de picos na região do espectro, que caracteriza a presença de açúcares. Este resultado se deve ao fato de ter sido utilizada cromatografia em papel e eluição das frações com metanol acidificado. Esse procedimento provavelmente provocou hidrólise da celulose do papel, provocando a liberação de açúcares na solução.

No entanto, os resultados espectrofotométricos e cromatográficos permitem afirmar que as três frações purificadas são malvidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-glicosídeo, como apresentado nas Figuras 10 e 11.

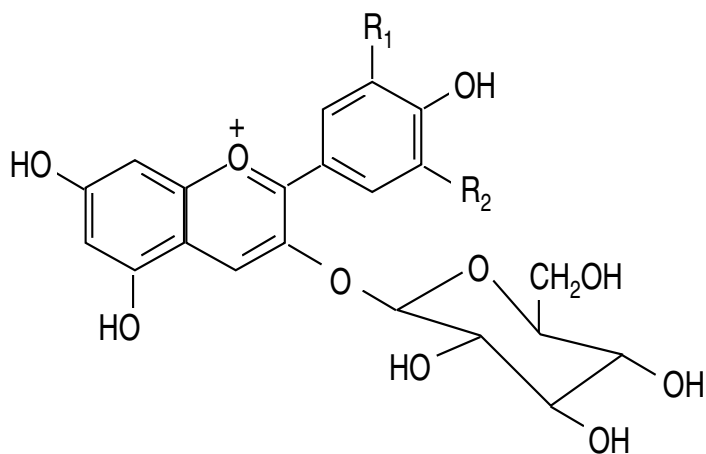
4.5. Efeito da retirada do tegumento na qualidade protéica

Os resultados das análises de proteína das três dietas cujas fontes protéicas eram feijão, feijão sem tegumento e caseína foram: 9,97%, 9,08% e 9,48%, respectivamente. Dessa forma, pode-se verificar que os teores de proteína das dietas preparadas atenderam aos padrões estabelecidos pelo NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1972), ou seja, entre 9 e 10% de proteína.

Quadro 21 - Relações percentuais entre A_{440}/A_{vis} das frações 1, 2 e 3 e dados da literatura para antocianinas

	A_{440}/A_{vis}
Fração 1	21
Fração 2	27
Fração 3	18
Cianidina e Peonidina 3-glicosídeo *	24
Cianidina e Peonidina 3-5-diglicosídeo *	13
Delfinidina, Petunidina e Malvidina 3-glicosídeo *	18
Delfinidina, Petunidina e Malvidina 3-5-diglicosídeo *	11
Pelargonidina 3-5-diglicosídeo*	21

* HARBORNE (1967).



R1 = OMe, R2 = OMe → malvidina 3 - glicosídeo (F1)
R1 = OH, R2 = H → cianidina 3 - glicosídeo (F2)

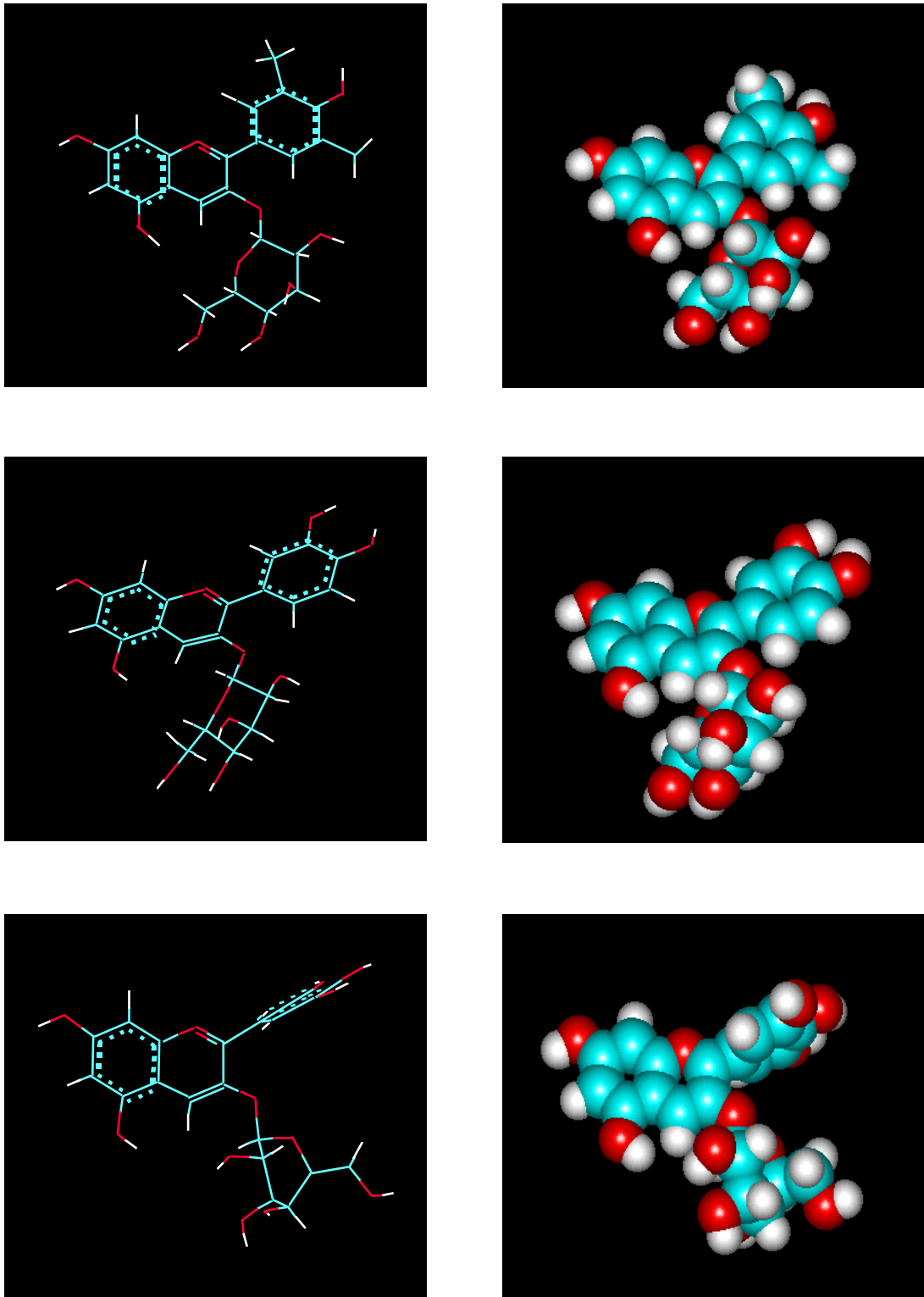


Figura 11 - Estruturas das frações F1, F2 e F3 em esqueleto e espaço cheio.

Com este experimento procurou-se avaliar a influência do tegumento do feijão na qualidade protéica do mesmo. Sabe-se que as proteínas do feijão apresentam deficiência em aminoácidos sulfurados, dentre os quais a metionina, que é um aminoácido essencial (SGARBIERI, 1987).

Os resultados obtidos de PER e NPR estão nos Quadros 22 e 23.

Observa-se que, em termos percentuais, os valores de PER apresentam maior diferença entre as rações à base de feijão, quando comparados com o NPR, e destas com relação à caseína. O NPR apresenta valores mais próximos entre as rações à base de feijão e valores superiores aos encontrados pelo parâmetro anterior com relação à caseína. Entretanto, mesmo elevando estes valores, as dietas à base de feijão apresentaram-se inferiores à de caseína em mais de 50%.

Além da deficiência em aminoácidos sulfurados, essa leguminosa apresenta o inconveniente da presença de fatores antinutricionais (polifenóis), que torna essa fonte protéica inferior à caseína (SGARBIERI, 1987). Polifenóis podem migrar para dentro do cotilédone, reagindo com proteínas durante o aquecimento, diminuindo, assim, sua digestibilidade (AW e SWANSON, 1985). Polifenóis também podem permanecer no caldo de cocção (BRESSANI et al., 1991).

O processo de descascamento reduz significativamente o conteúdo de taninos, mas a completa eliminação destes não é observada. Parte destes taninos migram para a solução de molho e são detectados em feijões descascados (DESHPANDE et al., 1982).

Dessa forma, a preservação do caldo de cocção e eliminação parcial do tegumento do feijão após este ter sido cozido resultariam em uma ração com polifenóis e menor teor de fibra. As diferenças observadas entre esta ração e outra ração preparada nos mesmos moldes, porém contendo o feijão integral (com tegumento), podem ser atribuídas à influência da presença do tegumento do feijão.

Um aquecimento excessivo tem um efeito negativo sobre o valor protéico do feijão, porque leva a um aumento na retenção de polifenóis no cotilédone

Quadro 22 - Resultados de PER, PER corrigido e NPR de caseína, feijão-preto com tegumento cozido e feijão-preto cozido com retirada parcial do tegumento após a cocção (média \pm desvio-padrão)

DIETA	PER (28 ^o dia)	PER corrigido (caseína 2,50)	NPR (14 ^o dia)
Caseína	3,26±0,09 (a)	2,50 (a)	4,2±0,08 (a)
Feijão-preto com tegumento	1,21±0,14 (b)	0,93 (b)	2,07±0,15 (b)
Feijão-preto sem tegumento	0,95±0,28 (c)	0,73 (c)	2,04±0,21 (b)

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de DUNCAN (P ### 0,05%).

Quadro 23 - Adequação do PER e NPR das rações testadas, calculados com relação aos valores médios obtidos para a caseína

RAÇÃO	%PER	%NPR
Caseína	100,00	100,00
Feijão com tegumento	37,25	49,37
Feijão sem tegumento	29,06	48,47

(AW e SWANSON, 1985) e diminui a disponibilidade de alguns aminoácidos, em particular a lisina (MOLINA et al., 1975).

Dietas preparadas com 10% de proteína de feijão *navy*, autoclavadas a 121°C/10 min, resultaram em PER de 1,53, quando comparadas com 2,5 para a caseína (Antunes e Markakis, 1977, citados por SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

BRESSANI e ELIAS (1983) encontraram valores de NPR para o feijão-preto de 1,79 ### 0,28.

Os valores obtidos para PER e PER corrigido diferiram significativamente entre as fontes protéicas estudadas, inclusive entre as amostras

à base de feijão. Já os valores de NPR indicaram que a diferença estatística só existe com relação à caseína e que as rações à base de feijão não diferem entre si. Isto é explicado pelo fato de o PER não levar em conta a utilização da proteína para manutenção, só para a promoção do crescimento, tendendo a subestimar a qualidade de proteínas inferiores e a superestimar proteínas de melhor qualidade, e, por este motivo, realça diferenças existentes entre proteínas de maior e menor valor nutricional, ao contrário do NPR (SGARBIERI, 1987).

As médias desses parâmetros, embora não tenham apresentado diferença estatística significativa, foram inferiores para o feijão sem tegumento. Segundo SGARBIERI (1987), enquanto o PER subestima, o NPR superestima a qualidade protéica das proteínas deficientes em lisina.

Considerando-se os resultados obtidos e as peculiaridades de cada método de avaliação utilizado, pode-se concluir que a retirada do tegumento do feijão após a cocção resulta em prejuízo para a qualidade protéica deste alimento.

Como foi preservado o caldo de cocção em ambas as amostras de feijão, excluindo-se apenas parte do tegumento em uma delas, esperava-se que o feijão sem o tegumento apresentasse melhor qualidade protéica, o que não ocorreu.

A digestibilidade de proteínas é considerada um condicionador de sua qualidade. Sabe-se que os alimentos de origem animal são de maior digestibilidade que os de origem vegetal (MARSHALL et al., 1979). Este fato tem sido atribuído à ausência de fibra nos alimentos de origem animal, que faz com que seja menor a velocidade do tempo de trânsito do conteúdo intestinal e, em conseqüência, se tenha maior absorção dos nutrientes.

O desempenho nutricional de um alimento depende da concentração, do balanço e da biodisponibilidade dos nutrientes nele contidos, que por sua vez é influenciado pela presença de fatores tóxicos e, ou, antinutricionais (SGARBIERI, 1987).

Dentre os fatores antinutricionais presentes nas leguminosas, os que têm maior interesse são os polifenóis, as lectinas e os inibidores de tripsina. Com relação aos polifenóis, eles se localizam principalmente no tegumento do grão e nas variedades coloridas (GOYCOOLEA et al., 1990). O papel destes fatores

antinutricionais sobre o desempenho nutricional das leguminosas poderia ser explicado pela formação de complexos entre os polifenóis e as proteínas, os quais são insolúveis e de baixa digestibilidade por monogástricos, podendo modificar a estrutura do epitélio intestinal, levando à inibição irreversível e, desta forma, diminuindo a capacidade absorptiva do organismo (BLANCO e BRESSANI, 1991; VILLANHUEVA, 1987).

Tanto a natureza química como o processamento e preparo dos alimentos para o consumo podem fazer com que os nutrientes se apresentem mais ou menos indisponíveis biologicamente. Esses fatores afetam diretamente os parâmetros indicativos do valor nutritivo desse alimento, quando determinados em ensaios biológicos (SGARBIERI, 1987).

A maioria das proteínas de origem animal apresenta boa digestibilidade, implicando melhor absorção de aminoácidos, ao passo que as de origem vegetal, geralmente, dão resultados inferiores.

A explicação para os resultados deste trabalho recai sobre a possibilidade da presença de alguma fração protéica no tegumento do feijão, a qual contribui para elevar a qualidade do mesmo, sobrepondo-se à possível influência negativa provocada pelo tegumento em si ou por outros fatores antinutricionais porventura presentes no mesmo.

Outro possível fator que explicaria esses resultados é a migração de polifenóis, durante o cozimento, para os cotilédones. A complexação destes polifenóis com proteínas as tornariam indisponíveis.

Segundo COELHO (1991), as proteínas do feijão são constituídas de dois tipos: metabólicas e de reserva. As proteínas de reserva são constituídas pelas globulinas e as metabólicas, pelas albuminas. Estas últimas geralmente possuem maior valor biológico, por conterem maior teor de aminoácidos sulfurados e lisina.

Os inibidores de tripsina presentes no feijão são certamente proteínas metabólicas, logo, são albuminas. Como os inibidores de tripsina são substâncias de defesa para a planta, possivelmente se localizam em sua porção mais externa, podendo estar no tegumento ou bem próximo a ele.

Com base nessas deduções, acredita-se que, com a retirada do tegumento do feijão, sejam perdidos também inibidores de tripsina. Em consequência, o feijão, que já é deficiente em aminoácidos sulfurados, torna-se mais deficiente ainda. Esse fato reflete-se no menor desempenho nutricional obtido para essa fonte protéica.

Além da perda de aminoácidos sulfurados, o grupo das albuminas também possui elevado teor de lisina, conforme citado anteriormente, que é um aminoácido facilmente destruído durante a cocção devido a reações com açúcares redutores (reação de Maillard).

A retirada do tegumento de feijão após este ter sido cozido, provavelmente, acarreta a perda de aminoácidos sulfurados e lisina, prejudicando sua qualidade protéica, não sendo, portanto, aconselhável esta prática. É possível que a retirada dos tegumentos antes da cocção leve a melhores resultados.

A deficiência de aminoácidos sulfurados, isoladamente, não parece ser o único fator responsável pelo baixo valor nutritivo de leguminosas cozidas, pois nenhuma correlação definitiva foi observada entre o conteúdo de aminoácidos sulfurados e o valor nutritivo destas leguminosas em termos de PER. Isto pode ser atribuído à baixa digestibilidade das proteínas de leguminosas e à viabilidade dos aminoácidos após o cozimento (LIENER, 1976). Para que estes aminoácidos sejam completamente utilizados por humanos, uma grande variedade de compostos antinutricionais potencialmente tóxicos precisam ser removidos ou destruídos, usualmente pelo calor (SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

FUKUDA et al. (1982) observaram que a suplementação com metionina melhora significativamente o desempenho nutricional do feijão cozido. Segundo estes autores, o feijão cozido possui atividade hemaglutinante, taninos e inibidores de tripsina em concentrações insuficientes para prejudicar o crescimento de animais, o que faz com que a simples complementação com metionina seja suficiente para elevar a qualidade nutricional de suas proteínas.

Acentuando esse problema, GOYCOOLEA et al. (1982) detectaram altas concentrações de taninos nos caldos de feijão em diferentes modalidades de preparação caseira e atribuíram a elas, juntamente com tratamento térmico

excessivo, a responsabilidade pelos baixos valores de PER encontrados em seus experimentos.

DESHPANDE et al. (1982) detectaram aumento de ácido fítico, bem como aumento das atividades dos inibidores de tripsina, quimiotripsina e α -amilase, depois do descascamento dos grãos de feijão. Eles atribuíram isso a dois fatores: primeiro, que a presença destes fatores antinutricionais pode ser característica das frações dos cotilédones; segundo, que o tegumento constitui substancial porção do peso dos grãos. Removendo este tegumento, haveria aumento da concentração destes fatores antinutricionais.

A partir dos resultados obtidos neste ensaio, foi sugerido um novo ensaio biológico que verificasse o efeito, na qualidade protéica, da retirada dos pigmentos, presentes no tegumento, antes do processo de cocção.

4.6. Efeito da extração de pigmentos na qualidade protéica

Foi proposto este ensaio biológico com o objetivo de avaliar a influência dos pigmentos identificados neste trabalho e de outros polifenóis na qualidade protéica do feijão.

Foram dosados os polifenóis dos grãos integrais e dos grãos após terem sido submetidos ao processo de extração de pigmentos. O processo de extração com etanol acidificado foi o mesmo utilizado na preparação do extrato bruto de feijão, no processo de identificação das antocianinas. Tomou-se o cuidado de submeter os grãos a secagem após a extração, para completa eliminação do resíduo de etanol.

O tratamento ao qual os feijões foram submetidos resultou em diminuição de 27,42% dos polifenóis presentes nos grãos. Os resultados das análises através do método de Folin-Denis foram de 0,062% de polifenóis nos grãos sem tratamento e 0,045% nos grãos submetidos a extração com álcool acidificado.

Optou-se pelo aproveitamento do caldo de cocção, para que não houvesse descarte de polifenóis que possam ter migrado para este líquido.

Os resultados das análises de proteína para as três rações cujas fontes protéicas eram feijão, feijão tratado e caseína foram de 9,32%, 9,71% e 9,73%, respectivamente.

Os resultados de PER, NPR, NPU, PER corrigido e digestibilidade obtidos estão nos Quadros 24 e 25.

Em termos percentuais, observou-se que os valores de PER apresentam maior diferença entre as rações à base de feijão, embora os valores dessas duas dietas não tenham diferido estatisticamente (Quadro 24). O NPR e NPU apresentam valores mais próximos entre estas rações.

Os baixos valores obtidos para as dietas a base de feijão podem ser atribuídos aos fatores antinutricionais presentes nesta leguminosa.

O tratamento com álcool possibilitou a migração de pigmentos e, com certeza, de outros polifenóis para os cotilédones, o que pôde ser percebido pela coloração destes após o tratamento. Esta migração possivelmente proporcionou a interação destes polifenóis com as proteínas dos cotilédones dos grãos. Desta maneira, a diminuição no teor de polifenóis, o que aumentaria a qualidade protéica, foi compensada pela maior interação entre estas proteínas e os compostos antinutricionais em estudo.

Compostos fenólicos em feijões têm sido determinados pelo método de Folin-Denis e expressos como ácido tânico ou pelo método da vanilina e expressos em equivalentes de catequina (BRESSANI e ELIAS, 1980).

Os efeitos nutricionais de polifenóis de leguminosas são sempre prejudiciais. Polifenóis (como taninos condensados) localizam-se

Quadro 24 - Resultados de PER, NPR, NPU, PER corrigido e digestibilidade de caseína, feijão-preto e feijão-preto submetido a extração de polifenóis (média \pm desvio-padrão)

PER (14ºdia)	NPR (14ºdia)	NPU (14ºdia)	PER cor caseína	digestibilidade (7 dias)
-----------------	-----------------	-----------------	--------------------	-----------------------------

	(2,50)				
Caseína	3,92±0,36(a)	4,61±0,34(a)	64,11±4,15(a)	2,50	93,61±9,68 (a)
Feijão	1,94±0,41(b)	3,09±0,41(b)	34,74±6,91(b)	1,24	85,10±2,30 (b)
Feijão submetido a extração	2,17±0,37(b)	3,05±0,34(b)	35,58±3,99(b)	1,38	84,59±1,51 (b)

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de DUNCAN (P ### 0,05%).

Quadro 25 - Adequação de PER, NPR, NPU, PER corrigido e digestibilidade de caseína, feijão-preto e feijão-preto submetido a extração de polifenóis, com relação aos valores médios obtidos para a caseína

	PER	NPR	NPU	digestibilidade
Caseína	100,00	100,00	100,00	100,00
Feijão	49,63	67,04	54,20	90,91
Feijão submetido a extração	55,28	66,24	55,50	90,37

predominantemente no pericarpo ou tegumento, particularmente em cultivares pigmentados (DESHPANDE et al., 1982).

Além da formação de complexos com proteínas, tornando-as indisponíveis, os polifenóis podem inibir enzimas digestivas (STANLEY e AGUILERA, 1985). Dentre os fatores antinutricionais, os polifenóis são os que mais contribuem para a baixa digestibilidade do feijão em animais e humanos. Isto pode ser explicado pela formação de complexos entre os polifenóis e as proteínas, os quais são insolúveis e de baixa digestibilidade, tornando a proteína parcialmente indisponível, ou através da inibição das enzimas digestivas e do aumento do nitrogênio fecal (BRESSANI e ELIAS, 1980).

A ligação com polifenóis pode tornar as proteínas menos susceptíveis a hidrólise enzimática no trato digestivo, aumentando o nitrogênio fecal e diminuindo a digestibilidade da proteína. Ligações de taninos com lisina de proteínas do feijão podem diminuir a disponibilidade deste aminoácido. Por outro lado, polifenóis livres podem influenciar indiretamente a digestibilidade protéica pela inibição de enzimas digestivas (REDDY et al., 1985). O relacionamento entre a concentração de taninos e a qualidade protéica é também evidente mesmo quando a proteína é suplementada com metionina (BRESSANI e ELIAS, 1980).

As características e o efeito das ligações entre proteína e polifenóis dependem do tipo de interação, covalente ou não-covalente. Ligações não-covalentes podem ocorrer em pH ácido ou neutro e são reversíveis. Os polifenóis que podem sofrer estas ligações são principalmente os polifenóis poliméricos ou taninos, embora polifenóis monoméricos ou não-taninos também possam se ligar não-covalentemente às proteínas. Como consequência, o valor nutricional é diminuído e a estrutura tridimensional das proteínas é modificada, alterando suas propriedades funcionais. As interações covalentes entre polifenóis e proteínas, juntamente com uma série de transformações enzimáticas, contribuem para o fenômeno de escurecimento. Estas interações são irreversíveis e, caso aminoácidos essenciais estejam envolvidos nas ligações com polifenóis, haverá um decréscimo do valor nutricional do alimento, além de alterações nas qualidades organolépticas (HERNANDEZ et al., 1991).

As antocianinas estão extremamente relacionadas aos taninos, usualmente sem cor, que sabidamente reagem com proteínas. Esses polifenóis podem reagir com proteínas, diminuindo sua digestibilidade e, portanto, sua qualidade. Assim, a cor dos diferentes cultivares de feijão influencia na utilização da proteína do feijão (ELIAS et al., 1979).

Além da presença de fatores tóxicos termolábeis como inibidores de tripsina, hemaglutininas, glicosídeos cianogênicos e outros, feijões também contêm pigmentos, que são os responsáveis pelas suas diferentes cores. Trabalhos anteriores com diferentes cultivares de feijão sugerem que a cor

influencia na utilização da proteína do feijão, pela diminuição da sua digestibilidade (ELIAS et al., 1979).

A cocção é a etapa de abrandamento com a absorção máxima de água, pela aplicação de calor úmido. Nesta etapa, a estrutura do grão modifica-se, sendo o amido geleificado e as proteínas, desnaturadas (HOHLBERG e STANLEY, 1987; VALLE-VEGA et al., 1990).

Aos nove minutos de cocção há diminuição de 80% na atividade antitripsina e 100% na atividade hemaglutinante (BONILLA et al., 1982) e, aos trinta minutos de cocção, 80 a 90% dos polifenóis são eliminados (GOYCOOLEA et al., 1982). Entretanto, alguns autores têm sugerido que essa redução dos polifenóis é aparente e está mais relacionada com sua solubilidade e reatividade química. Eles podem se ligar às proteínas e a outras substâncias orgânicas ou sofrer transformações na estrutura química, tornando-se não-detectável pelos métodos químicos disponíveis (AMAYA et al., 1991).

Estudos indicam que os polifenóis são, dentre os fatores antinutricionais, os que mais contribuem para a baixa digestibilidade do feijão (BRESSANI e ELIAS, 1984; BRESSANI et al., 1991). Entretanto, grande parte desses compostos passa para o líquido de cocção, e, dessa forma, a eliminação do caldo de cocção possibilita a eliminação de boa quantidade de polifenóis (GOMES et al., 1979).

Com relação ao desempenho nutricional desse alimento, MARQUEZ e LAJOLO (1981) demonstraram que animais alimentados com feijão integral apresentam elevada excreção de nitrogênio fecal, contribuindo, assim, para que as proteínas do feijão tenham um aproveitamento nutricional reduzido.

Taninos afetam a utilização de proteína em feijões através do aumento de nitrogênio fecal, como fica evidente em estudos com ratos. Em humanos, o efeito é similar, embora seja menor que em ratos (BRESSANI e ELIAS, 1980).

A origem do nitrogênio fecal e de enxofre em ratos alimentados com feijões cozidos inteiros ou albuminas e globulinas extraídas dos feijões foi esclarecida por MARQUEZ e LAJOLO (1991). Feijões marcados radiativamente

com ^{15}N e ^{35}S foram empregados para separar eliminação de proteína exógena (proteína dietética não-digerida) de eliminação de proteína endógena (sinais de descamação da mucosa e, ou, de elevada secreção de enzimas digestivas). A metodologia convencional usada previamente não considerava os processos metabólicos específicos de absorção e secreção que ocorrem no trato gastrointestinal e que alteram significativamente a composição do nitrogênio fecal. O consumo de feijões inteiros e, em menor extensão, as albuminas isoladas do feijão levaram a um aumento na excreção de nitrogênio exógeno e endógeno. Contrariamente, globulinas de feijão cozido foram bem digeridas, não tendo nenhum efeito na perda do nitrogênio metabólico. Outros componentes, não-protéicos, presentes no feijão inteiro também podem estar envolvidos no aumento da proteína fecal (tanto endógena, quanto exógena).

O conteúdo de proteína fecal de ratos alimentados com dieta livre de proteína e com dieta à base de caseína é baixo (7,1 e 7,9%, respectivamente) e o de ratos alimentados com dieta à base de feijão cru é maior (43,8%), enquanto o de ratos alimentados com dieta composta de feijão termicamente processado é intermediário (25,6 a 36,0%) (WU et al., 1995).

A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo (BRESSANI e ELIAS, 1979). É o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização protéica da dieta. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes, ou transformada em produtos do metabolismo pelos microrganismos do intestino grosso (SGARBIERI, 1987).

Segundo Jaffe, citado por COELHO (1991), os tegumentos das sementes apresentam menor digestibilidade que o feijão integral e seu endosperma, provavelmente em função de conterem teores relativamente elevados de compostos fenólicos e fitatos. Alimentos preparados a partir de feijão descascado apresentam maior digestibilidade, sendo mais recomendados para dietas especiais (merenda escolar e outras onde se requer maior aproveitamento protéico).

A diminuição de 27,42% dos polifenóis presentes no feijão-preto não provocou alteração significativa na qualidade protéica, em nível de 5%, pelo teste de Duncan. A explicação para esse fato recai na ocorrência de migração dos pigmentos e outros polifenóis para os cotilédones, o que provocou maior interação entre estes compostos e as proteínas, diminuindo a sua biodisponibilidade.

Taninos solúveis em água se difundem para o cotilédone e aparentemente reagem com proteínas do feijão durante o processo de aquecimento. A difusão de taninos solúveis em água para os cotilédones de feijões-pretos durante o molho é confirmada pelo fato de taninos serem detectados em cotilédones de feijões-pretos submetidos a molho em água e não serem detectados em feijões-pretos submetidos a molho em heptano (AW e SWANSON, 1985).

Os taninos têm grande afinidade pelas proteínas e formam complexos insolúveis em pH fisiológico e que não se dissociam. Estes complexos são resistentes à hidrólise enzimática e, subseqüentemente, são excretados. A presença de taninos na dieta causa diminuição na retenção de nitrogênio em animais e humanos (REDDY et al., 1985).

Os tegumentos das sementes de feijão devem suas cores a diferentes polifenóis (antocianinas) que estão extremamente relacionados aos pigmentos tânicos usualmente sem cor, que sabidamente reagem com proteínas. Os resultados obtidos sugerem que os pigmentos presentes nos tegumentos dos grãos de feijão dos cultivares estudados contêm altos níveis de taninos e outros polifenóis. É sugerido que estes polifenóis podem reagir com proteínas, diminuindo sua digestibilidade e, assim, sua qualidade (ELIAS et al., 1979).

Grupos hidrofóbicos parecem estar envolvidos na formação e estabilização de complexos tanino-proteína. Um estudo da interação entre taninos condensados e poliaminoácidos indicou que o número de grupos metileno na cadeia lateral do aminoácido foi positivamente relacionado com a magnitude da interação. A presença de doadores de hidrogênio, na forma de hidroxifenólicos, em taninos, e de aceptores de hidrogênio, na forma de funções carbonila, nas ligações peptídicas das proteínas, favorecem a formação de pontes de hidrogênio.

Além disso, desde que ambos os grupos contenham regiões hidrofóbicas, o núcleo aromático dos taninos e as cadeias alifática e aromática laterais dos aminoácidos da proteína, é possível que estes participem do fenômeno de interação (OH et al., 1980).

A digestibilidade das proteínas decresce com o aumento da pigmentação do tegumento da semente. Os pigmentos são, geralmente, compostos fenólicos, que podem interagir com as proteínas do feijão, decrescendo a sua digestibilidade e utilização. Os polifenóis se encontram nas plantas como metabólitos secundários, raramente ativos. Sua habilidade de formar compostos complexos e de precipitar as proteínas faz com que sejam importantes sob o ponto de vista nutricional (BRESSANI et al., 1991). Por exemplo, Jaffe, 1950, citado por SGARBIERI e WHITAKER (1982), encontrou valores de 76,8; 79,5 e 84,1% para digestibilidade *in vivo* de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) preto, rosa e branco, respectivamente. Possivelmente, os inibidores enzimáticos, como os taninos ou polifenóis, podem ser parcialmente responsáveis por essa baixa digestibilidade, mas estes compostos nas leguminosas não têm sido estudados com profundidade e há poucos estudos em animais que indiquem que eles afetam diretamente a qualidade nutricional. Não obstante, há evidências que fazem pensar que os polifenóis são os que contribuem mais para a baixa digestibilidade da proteína do feijão (BRESSANI et al., 1991).

SGARBIERI et al. (1979) mostraram a digestibilidade e o valor nutritivo de quatro variedades brasileiras de *Phaseolus vulgaris* (“Rico 23”, preto; “Rosinha G2”, rosa; “Carioca”, amarronzado; e “Piratã”, marrom). Os valores de PER para proteína total da farinha autoclavada (121°C/15 min) destas variedades foram de 0,75; 0,85; 1,12 e 1,32 para o Carioca, Rosinha G2, Piratã 1 e Rico 23, respectivamente. A digestibilidade das proteínas foi de 44, 45, 45 e 39% para os feijões não-termotratados e 64,5; 58; 69,5; e 52% para feijões autoclavados.

DUARTE (1995) observou, através de determinação de NPR, NPU e digestibilidade, que a eliminação do caldo de cocção de feijões-pretos incrementou os valores destes índices, mas foi significativa somente para a digestibilidade. Os valores encontrados pela autora estão no Quadro 26. Ela

atribuiu esses resultados à eliminação do caldo de cocção e conseqüente perda de polifenóis.

Cerca de 60, 67 e 37% dos polifenóis totais de feijões crus permanecem nos grãos pretos, brancos e vermelhos, respectivamente, após o cozimento (BRESSANI et al., 1983). A água de cocção contém menos de 20% dos polifenóis totais.

No entanto, embora relativamente grandes quantidades de polifenóis possam ser eliminadas na água de lavagem e na água utilizada para o cozimento, o resíduo é retido, principalmente pelos cotilédones. Isto pode ser devido à migração aparente dos taninos do tegumento para os cotilédones. As quantidades de taninos ingeridas irão, então, depender de como os feijões são processados e consumidos (BRESSANI e ELIAS, 1980).

Quadro 26 - Resultados de NPR, NPU e digestibilidade (média \pm desvio-padrão) (DUARTE, 1995)

Dieta	NPR	NPU	Digestibilidade
Caseína	5,24 \pm 0,84	63,30 \pm 5,32	95,97 \pm 1,00
Feijão-preto com caldo	2,97 \pm 0,41	33,45 \pm 3,03	72,25 \pm 4,38
Feijão-preto sem caldo	2,22 \pm 0,53	33,91 \pm 4,04	79,19 \pm 8,06

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Etanol 70% acidificado com 0,5% de HCl foi eficiente para extração de antocianinas de feijão.

A cromatografia descendente em papel utilizando BFW (15:2,5:2,4) como fase móvel mostrou ser uma técnica eficaz na separação das antocianinas presentes no extrato bruto de feijão.

O extrato de antocianinas de feijão é constituído de seis frações antociânicas diferentes, das quais três foram identificadas.

A utilização de métodos espectrofotométricos UV-visível, técnicas cromatográficas em papel e HPLC e reações químicas específicas para antocianinas foi suficiente para identificar as estruturas de três frações de antocianinas do feijão.

As três frações principais purificadas foram identificadas como malvidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-glicosídeo.

Mediante os resultados encontrados em ensaios biológicos, pode-se concluir que a retirada do tegumento do feijão após a cocção, mesmo que parcialmente, reduz seu valor protéico, provavelmente pela eliminação simultânea de aminoácidos sulfurados e lisina provenientes de proteínas presentes no tegumento.

A cocção, através da temperatura elevada, provoca desnaturação de proteínas que atuam como fatores antinutricionais nos alimentos vegetais. Estas proteínas, uma vez desnaturadas, vão contribuir para elevar o valor nutricional das proteínas vegetais, sendo, portanto, inconveniente eliminá-las dos alimentos.

A extração etanólica de polifenóis de feijão não resultou em aumento da qualidade protéica, como se esperava. Esse tratamento, provavelmente, provocou a migração destes polifenóis presentes originalmente no tegumento para os cotilédones. Esta migração, possivelmente, proporcionou a interação destes polifenóis com as proteínas dos cotilédones dos grãos. Desta maneira, a diminuição no teor de polifenóis, que aumentaria a qualidade protéica, foi compensada pela maior interação entre as proteínas e os compostos antinutricionais em estudo.

Novos ensaios biológicos se fazem necessários para esclarecimento da participação dos polifenóis como fator responsável pela diminuição da qualidade protéica. Um ensaio em que se comparassem dietas à base de caseína adicionadas ou não de polifenóis extraídos do feijão seria uma das possibilidades para obter resultados mais conclusivos.

Trabalhos objetivando o conhecimento dos isoflavonóides presentes no feijão, bem como de suas ações terapêuticas, seriam relevantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAYA, H., ACEVEDO, E., BRESSANI, R. Efecto del recalientamiento sobre la disponibilidad de hierro y el valor nutritivo de la proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) cocido. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 41, n. 2, p. 222-37, 1991.
- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutrition Studies. **Journal of Nutrition**, Baltimore. v. 107, p. 1340-1348, 1977.
- ANDERSEN, O.M., FRANCIS, G.W. Simultaneous analysis of anthocyanins and anthocyanidins on cellulose thin layers. **Journal of Chromatography**, v. 318, p. 450-454, 1985.
- ASEN, S. Known factors responsible for infinite flower color variations. **Acta Hortic.**, v. 63, p. 217-223, 1976.
- ASEN, S., STEWART, R.N., NORRIS, K.H. Anthocyanin, flavonol copigments and pH responsible for larkspur flower color. **Phytochem.**, v. 14, p. 2677-2682, 1975.
- ASEN, S., STEWART, R.N., NORRIS, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. **Phytochem.**, v. 11, p. 1139-1144, 1972.
- ASEN, S., STEWART, R.N., NORRIS, K.H., et al. A stable blue nonmetallic copigment complex of delphinin and C-glycosylflavones in Prof. Blaauw Iris. **Phytochem.**, v. 9, p. 619-627, 1970.

- ASQUITH, T. N., BUTLER, L.G. Interactions of condensed tannins with selected proteins. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1591-1593, 1986.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 9th ed. Washington, DC. 1960. 111p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 11th ed. Washington, DC, 1970. 108p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 12th ed. Washington, DC. 1975. 110p.
- AW, T. L., SWANSON, B. G. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 1, p. 67-71, 1985.
- BAKKER, J., BRIDLE, P., BELLWORTHY, S.J. Strawberry juice colour: the effect of some processing variables on the stability of anthocyanins. **J. Sci. Food Agric.**, v. 64, p. 31-37, 1994.
- BENDER, A.E., DOELL, B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **Brit. J. Nutr.**, v. 11, p. 138-43, 1957.
- BHATTHY, R. S. Albumin proteins of eight edible grain legume species: eletroforetic patterns and aminoacid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 620-622, 1982.
- BLANCO, A. BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoacidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.
- BLOM, H., THOMASSEM, M.S. Kinetic studies on strawberry anthocyanin hidrolisis by a thermostable anthocyanin- β -glycosidase from *Aspergillus niger*. **Food Chemistry**, v. 17, p. 157-168, 1985.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Varela, 1992. 223p.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Anthocyanins of the brazilian fruit *Cyphomandra betacea*. **Food Chemistry**, v. 12, p. 189-195, 1983.
- BONILLA, A. R., CALZADA, C., COOKE, R. Efectos de la coccion tradicional sobre os fatores antinutricionales de los frijoles negros (*Phaseolus vulgaris*)

de Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 32, n. 2, p. 308-325, 1982.

BRESSANI, R., ELIAS, L.G. Mejoramiento de la calidad nutricional de las leguminosas. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE INTEGRAÇÃO DA PESQUISA NUTRICIONAL E ALIMENTAR, João Pessoa-PB, **Anais...** Campinas, ITAL, 1979.

BRESSANI, R., ELIAS, L.G. Relacion entre la digestibilidad y el valor proteínico del frijol comun (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 34, n. 1, p. 189-197, 1984.

BRESSANI, R., ELIAS, L. G. The nutritional role of polyphenols in beans. In: Hulse, J. H **Polyphenols in Cereals and Legumes**. Ottawa, Canada, 1980. p. 61-72.

BRESSANI, R., ELIAS, L.G., WOLZACK, A. et al. Tannin in common beans: methods of analysis and effects on protein quality. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1000-1003, 1983.

BRESSANI, R. Legume in human diets and how they might be improved. In: Protein advisory group of the united nations system. **Nutritional improvement of food legumes by breeding**. New York, 1973. p. 15-42.

BRESSANI, R., MORA, D.R., FLORES, R. et al. Evaluation de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles en frijol crudo y cocido, y efecto que estos provocan en la digestibilidad de la proteina. **Archivos Latinamericanos de Nutrición**, v. 41, n. 4, p. 569-583, 1991.

BRESSANI, R. Research needs to up-grade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Qual. Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 32, p. 101-110, 1983.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed.) **Anthocyanins as Food Colors**. New York, Academic Press, 1982. p. 1-40.

BURR, H. K. Effect of storage on cooking qualities, processing and nutritive values of beans. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 23, p. 81-92, 1973.

BUTLER, L. G., PRICE, M. L., BROTHERMON, J. E. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimations of degree of polymerization. **J. Agric. Food Chem.**, v. 30, p. 1087, 1980.

- CARMONA, A., SEIDL, D.S., JAFFE, W.G. Comparison of extraction. methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 56, p. 291-301, 1991.
- CLYDESDALE, F.M. Physicochemical determinants of iron availability. **Food Technology**, v. 37, p. 133, 1983.
- COELHO, J.V., LAJOLO, F.M. Evolução dos fenólicos totais e taninos condensados (proantocianidinas) durante o desenvolvimento das sementes do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 43, n. 1, p. 61-65, 1993.
- COELHO, R.G. Considerações sobre as proteínas do feijão. **Rev. Nutr PUCAMP**, v. 4, p. 122-145, 1991.
- DE BOLAND, A.R., GARNER, G.B., O'DELL, B.L. Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, p. 1186, 1975.
- DESHPANDE, S.S., CHERYAN, M. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 905-910, 1985.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 695-699, 1989.
- DESHPANDE, S.S., NIELSEN, S. S. In vitro enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1326, 1987.
- DESHPANDE, S.S., SATHE, S.K., SALUNKE, D.K. et al.. Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 47, n. 6, p. 1846-1850, 1982.
- DONDERO, M.L., BADILLA, M.J. Obtencion de antocianinas a partir de orujo de uva y su aplicacion en alimentos (1). **Rev. Chil. Nutr.**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1983.
- DRAETTA, I.S., IADEROZA, M., BALDINI, V.L.S., et al. Antocianinas de Ameixa (*Prunus salicina* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 5, n. 1, p. 31-38, 1985.
- DU, C.T. and FRANCIS, F.J. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdarifa* L.) **Journal of Food Science**, v. 38, p. 810-812, 1973.

- DUARTE, M.S.L. **Efeito do tegumento e do caldo de cocção do feijão na qualidade protéica.** Viçosa, MG: UFV, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- ELIAS, L.G., FERNÁNDEZ, D.G., BRESSANI, R. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 2, p.524-527, 1979.
- ERDMAN JR., E.W. Oilseed phytates: nutritional implications. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 56, p. 736-741, 1979.
- EVANS, R.J., BAUER, D.H., SISAK, K.A., et al. The availability for the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 779-784, 1974.
- EVANS, R.J., BAUER, D.H. Studies of the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 779-784, 1978.
- FERNÁNDEZ, R., ELIAS, L.G., BRAHAM, J.E., et al. Trypsin inhibitors and hemagglutinins in beans (*Phaseolus vulgaris*) and their relationship with the content of tannins and associated polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 734-9, 1982.
- FORNI, E., POLESELLO, A., TORREGGIANI, D. Changes in anthocyanins in cherries (*Prunus avium*) during osmodehydration, pasteurization and storage. **Food Chemistry**, v. 48, p. 295-299, 1993.
- FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food color.** New York, Academic Press, 1982. p. 181-207.
- FRANCIS, F.J. A new group of food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 27-30, 1992.
- FRANCIS, F.J. Antocianins. In: **Current Aspects of Food Colorants.** Chleveland: Ed. T.E. Furia, CRC Press, 1977. p. 19-27.
- FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins, CRC Critical Reviews. In: **Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.
- FRANCIS, F.J., HARBORNE, J.B. Anthocyanins of garden huckleberry, *Solanum guineense*. **Journal of Food Science**, v. 31, p. 524-528, 1966.

- FUKUDA, G., ELIAS, L.G., BRESSANI, R. Significado de algunos factores antifisiológicos y nutricionales en la evaluación biológica de diferentes cultivares de frijol común (*Phaseolus* sp.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 32, n. 4, p. 945-960, 1982.
- FULEKI, T. Anthocyanins in red onion, *Allium cepa*. **Journal of Food Science**, v. 36, p. 101-104, 1971.
- FULEKI, T., FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins. I. Extration and determination of total anthocyanins in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p.72-77, 1968.
- GEIL, P.B., ANDERSON, J.W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 13, n. 6, p. 549-558, 1994.
- GEISSAN, T.A., JORGENSON, E.C., HARBORNE, J.B. The effect of aluminium chloride on absorption spectra of anthocyanins. **Chem. Ind.**, v. 1389, December, 1953.
- GEISSMAN, T.A., **The Chemistry of Flayonoid Compounds**. New York, The MacMillan Co., 1962. 666 p.
- GOMES, J.C., KOCH, U., BRUNNER, J.R. Isolation of a trypsin inhibitor from navy beans by affinity chromatography. **Cereal Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 525-529, 1979.
- GOMEZ-BRENES, R.A., NUÑES, E.I., BRESSANI, R., et al. Comportamiento biológico de fracciones proteínicas aisladas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 33, n. 3, p. 519-538, 1983.
- GOYCOOLEA, F., GONZÁLEZ, E., BARRON, J.M. et al. Efecto de los tratamientos caseros en la preparaciós de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris*) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 15, n. 2, p. 263-273, 1990.
- GOYCOOLEA, F., MEJIA, E.G., BRAHAM, J.E., BRESSANI, R. Trypsin inhibitors and hemagglutinins in beans (*Phaseolus vulgaris*) and their relationship with the content of tanins and associated polyphenols. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 734-9, 1982.
- GRAF, E. Applications of phytic acid. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 60, p. 1861-1865, 1983a.

- GRAF, E. Calcium binding to phytic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 851, 1983b.
- GUEDES, M.C. **Influência do anel b na estabilidade das antocianidinas e antocianinas**. Campinas, SP: UNICAMP, 1993. 126p. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade de Campinas, 1993.
- GUIMARÃES, I.S.S. Corantes naturais vermelhos e amarelos. In: **Resumos do I Simpósio sobre aditivos para alimentos**. ITAL, Campinas, 1987. p.21-25.
- GUPTA, Y. P. Antinutritional and toxic factors in food legumes: a review. **Plant Foods Hum, Nutr.**, v. 37, p. 201, 1987.
- HANSEN, K., JACOBSEN, F., FLINK, J.M. Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). Process considerations for production of the liquid extract. **Journal of Food Technology**, v. 20, p. 703-711, 1985.
- HARBORNE, J.B. **Comparative biochemistry of the flavonoids**. New York, Academic Press. Cap 1. 1967.
- HARBORNE, J.B. Plant polyphenols - XI. The structure of acylated anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 3, p. 151-160, 1964.
- HARBORNE, J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. **Biochem. J.**, v. 70, p. 22-28, 1958b.
- HARBORNE, J.B. The chromatographic identification of anthocyanins pigments. **J. Chromatog.**, v. 1, p. 473-488, 1958a.
- HARBORNE, J.B. Variation and functional significance of phenolic conjugation in plants. In: SWAIN T., HARBORNE J. G., VAN SUMERE C. F. (eds.) **Recent advances in phytochemistry**, vol. 12. New York: Plenum Press, 1979. p. 457-474.
- HERNANDEZ, T., HERNANDEZ, A., MARTINEZ, C. Polyphenols in alfafa leaf concentrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1120-1122, 1991.
- HOHLBERG, A.I., STANLEY, D.W. Hard-to-cook defect in black beans. protein and starch consideration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 571-576, 1987.
- HONOVAR, P.M., SHIH, C.V., LIENER, I. E. Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. **J. Nutr.**, v. 77, p. 109-114, 1962.

- HRAZDINA, G. Anthocyanins. In: HARBORNE, J.B., MABRY, T. (eds.) **The Flavonoids, A Advances in Research**. Champman-Hall, 1982. p.135-188.
- JACKMAN, R.L., YADA, R.Y., TUNG, M.A. A review. Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **J. of Food Biochemistry**, v. 11, p. 279-308, 1987.
- JAFFÉ, W.G., HANNIG, K. Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 109, p. 80, 1965.
- JAFFÉ, W.G., MORENO, R., WALLIS, V. Amylase inhibitors in legume seeds. **Nutr. Rep. Int.**, v. 7, p. 169-174, 1973.
- JOHNSON, V.A., LAT, C.L. Genetic improvement of plant proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, p. 558-66, 1974.
- JURD, L., ASEN, S. The formation of metal and copigment complexes of cyanidin 3-glucoside. **Phytochem.**, v. 5, p. 1263-1271, 1966.
- JURD, L. Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins. **Journal Food Sci.**, v. 29, p. 16-19, 1964.
- JURD, L. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. In **The Chemistry of Plant Pigments**, New York, Academic Press. 1972. p. 123-142.
- KAKADE, M.L., ARNOLD, R L., LIENER, I E., et al. Unavailability of cystine from trypsin inhibitors as a factor contributing to the poor nutritive value of navy beans. **J. Nutr.**, v. 99, p. 34-42, 1969.
- KAKADE, M.L., EVANS, R.J. Nutritive value of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). **Brit. J. Nutr.**, v. 19, p. 269-276, 1965.
- KARPA, J., KALLIO, H., PELTONEN, I., et al. Anthocyanins of crowberry, *Empetrum nigrum* coll. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 634-636, 1984.
- LASKOWSKI, M., JR., KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 593-626, 1980.
- LIAO, H., CAI, Y., HASLAM, E. Polyphenol interactions. Anthocyanins: copigmentation and colour changes in red wines. **J. Sci. Food Agri.**, v. 59, p. 299-305, 1992.
- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins). **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 27, p. 291-319, 1976

- LIENER, I.E. Protease inhibitors and lectins. In: Neuberger, A., Juckes, T. H. (Eds.). **International Review of Biochemistry, Biochemistry of Nutrition.** University Park Press, Baltimore, 1979.
- LIKUSKI, H.J.A., FORBES, R.M., Effect of phytic acid on availability of zinc in amino acid and casein diet fed to chicks. **J. Nutr.**, v. 84, p. 145, 1964.
- LOLAS, G.M., MARKAKKIS, P., Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 13, 1975.
- LU, T.S., SAITO, N., YOKOI, M. Acylated pelargonidin glycosides in the red-purple flowers of *Phaseolus nil*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 289-295, 1992.
- MA, Y., BLISS, F.A. Tannin content and inheritance in common beans. **Crop Sci.**, v. 18, p. 201-204, 1978.
- MAGA, J.A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis. **J. Agric Food Chem.**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 1982.
- MANGAN, J.L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. **Nutrition Research Reviews**, v. 1, p. 209-231, 1988.
- MARKAKIS, P. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed.) **Anthocyanins as Food Colors.** New York, Academic Press, p. 163-178. 1982.
- MARQUEZ, U.M.L., LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 29, p. 1068-1074, 1981.
- MARQUEZ, U.M.L., LAJOLO, F.M. *In vivo* digestibility of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of endogenous protein. **J. Agric Food Chem.**, v. 39, p. 1211-1215. 1991.
- MARSHALL, J.J., LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase from the kidney bean. *Phaseolus vulgaris*. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 8030-8037, 1975.
- MARSHALL JR., H.F., WALLACE, G.W., SATERLEE, L.D. Prediction of protein digestibility by *in vitro* procedure using human, porcine and rat pancreatic preparations. **Nutr. Rep. Int.**, v. 19, p. 901, 1979.

- MARTINEZ-ARAGON, A., CAVALLE, C., FRUNBECK, G., et al. Identification and biological activity of lectins of different subunit composition isolated from *Phaseolus vulgaris* L. var *athropurpurea*. **J. Sci Food Agric.**, v. 5, p. 375-381, 1995.
- MAZZA, G., BROUILARD, R. Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **Journal Agric. Chem.**, v. 35, n. 3, p. 422-426. 1987a.
- MAZZA, G., BROUILARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, p. 207-225, 1987b.
- MILLER, D.S., BENDER, A.E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **Brit. J. Nutr.**, v. 9, p. 382-388, 1955.
- MOLINA, M.R., LA FUENTE, G., BRESSANI, R. Interrelationships between storage, soaking time, nutritive value and other characteristics of the black bean (*Phaseolus Vulgaris*). **Journal of Food Science**, v. 40, p. 587-591, 1975.
- MORI, T., SAKURAI, M. Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; effects of sugar and nitrogen. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 3, p. 588-593, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of domestic animals**. N^o 10. Nutrient requirements of laboratory animals, 2nd edition, Washington, D.C. National Academy of Sciences/National Research Council, 1972.
- NAVERT, B., SANDSTROM, B.M., CEDERBLAD, A. Reduction of the phytate content of bread and its effects on zinc absorption in man. **Br. J. Nutr.**, v. 53, p. 47, 1985.
- NIELSEN, S.S. Digestibility of legume protein. **Food Technology**, v. 45, p. 112, 1991.
- NOZZOLILO, C. Anthocyanin pigments in bean seedlings. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2552, 1971.
- OBERLEAS, D., MUHRER, M.E., O'DELL, B.L. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. **J. Nutr.**, v. 90, p. 56, 1966.
- OH, H.I., HOFF, J.E, ARMSTRONG, G.S., et al.. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. **J. Agric Food Chem.**, v. 28, p. 394-398, 1980.

- OLIVEIRA, J. E. D. Studies on the nutritive value of beans. In: JAFFÉ, W.G. (Ed.). **Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods**. Caracas, 1973. p. 13-26.
- OSBORN, T.C., BLAKE, T., GEPTS, P., et al. Bean arcelin 2: genetic variation inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. **Theor. Appl. Genet.**, v. 71, p. 847, 1986.
- OSBORN, T.C., BURROW, M., BLISS, F.A Purification and characterization of arcelin seed protein from common beans. **Plant Physiol**, v. 86, p. 399, 1988.
- OSBORN, T. C. Genetic control of bean seed protein **CRC Crit. Ver. Plant Sci.**, v. 7, p. 93-116, 1988.
- OSZMIANSKI, J.C., SAPIS, J.C. Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (Chokeberry). **Journal of Food Science**, v. 53, n. 4, p. 1241-1242, 1988.
- PEREZ-MALDONADO, R.A., NORTON, B.W., KERVEN, G.L., Factors affecting in vitro formation of tannin-protein complexes. **J. Sci. Food Agric**, v. 69, p. 291-298, 1995.
- POEL, T.F.B., BLONK, J., ZUILICHEM, D.J., OORT, M.G., Thermal inactivation of lectins and trypsin inhibitor activity during steam processing of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and effects on protein quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 53, n. 2, p. 215-228, 1990.
- POWERS, J.R., WHITAKER, J.R.. Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean (*Phaseolus Vulgaris*) α -amylase inhibitor. **J. Food Biochem.**, v. 1, p. 217-238, 1977.
- REDDY, N.R., PIERSON, M.D. Isolation and partial characterization of phytic acid-rich particles from great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of Food Science**, v. 52, p. 109, 1987.
- REDDY, N.R., PIERSON, M.D., SATHE, S.K. et al. Dry bean tannins: a review of nutritional implications. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 62, p. 541-549, 1985.
- REYES-MORENO, C., PAREDEZ-LÓPEZ, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.
- ROMERO, J., RYAN, D.S. Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L., to *in vitro* enzymatic hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 784-788, 1978.

- ROMERO-ANDREAS, J., YANDELL, B.S., BLISS, F.S. Bean arcelin inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. and its effect on seed composition. **Theor. Appl. Genet.**, v. 72, p. 123, 1986.
- SAITO, N., HARBORNE, J.B. Correlations between anthocyanin type, pollinator and flower colour in the labiatae. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3009-3015, 1992.
- SAKELLARIADES, H.C., LUH, B.S. Anthocyanins in *Barbera grapes*. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 329-333, 1974.
- SALUNKHE, D.K., JADHAV, S.J., KADAM, S.S., et al. Chemical biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 277-305, 1982.
- SÃO JOSÉ, E.B., GOMES, J.C., MATSUOKA, K., et al. Características do endurecimento do tegumento do feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arq. Biol. e Tecnol.**, v. 29, n. 4, p. 633-650, 1986.
- SATHE, S.K., DESHPANDE, S.S., SALUNKHE, D.K., Dry beans of *Phaseolus*: a review I. chemical composition: proteins. **CRC Crit. Ver. Food Sci. Nutr.**, v. 20, 1984.
- SAVELKOUL, F.H.M.G., VAN DER POEL, A.F.B., TAMMINGA, S. The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 42, p. 71-85, 1992.
- SCHEFFELDT, P., HRAZDINA, G. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. **J. Food Sci.**, v. 43, p. 517-520. 1978.
- SCHNEEMAN, B.O. Dietary fiber, chemistry, physiology and health effects. In: KRITCHEVSKY et al. Plenum Press, New York and London, 1990, 499p.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas, UNICAMP, 387p. 1987.
- SGARBIERI, V.C., ANTUNES, P.L., ALMEIDA, L.D. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Journal of Food Science**. v. 44, p. 1306-1308, 1979.
- SGARBIERI, V.C., WHITAKER, J.R. Partial characterization of trypsin-chymotrypsin inhibitors from bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha G2): chemical and physical properties. **J. Food Biochem.**, v. 5, p. 215-232, 1981.

- SGARBIERI, V.C., WHITAKER, J.R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 93-166, 1982.
- SHI, Z., LIN, M., FRANCIS, F.J. Anthocyanins of *Tradescantia pallido*, potencial food colorants. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 761-765, 1992.
- SHRIKHANDE, A.J., FRANCIS, F.J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. **J. Food Science**, v. 39, p. 904-906, 1974.
- SMIRNOFF, P., KHALEF, S., BIRK, Y., APPLEBAUM, S.W. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from chick peas. **Int. J. Pept. Protein Res.**, v. 14, p. 186-192. 1979.
- STANLEY, D.W., AGUILERA, J.M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes - The influence of structure and composition. **J. Food Biochem.**, v. 9, p. 277-323, 1985.
- STANLEY, D.W., MICHAELS, T.E., PLHAK, L.C., et al. Storage-induced hardening in 20 common beans cultivars. **J. Food Qual.**, v. 13, p. 233, 1990.
- STANTON, W.R., FRANCIS, B.J. Ecological significance of anthocyanins in the seed coats of the phaseoleae . **Nature**, v. 211, p. 970-971, 1966.
- STRACK, D., WRAY, V. Anthocyanins. In: **Methods in Plant Biochemistry**. vol. 1, Academic Press. p. 325-353. 1989.
- STRINGHETA, P.C. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv)**. Campinas, SP: UNICAMP, 1991. 138p. Dissertação (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Campinas, 1991.
- SWAIN, T., HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 10, Jan., 1959.
- SWENEY, J.G., IACOBUCCHI, G.A. Effects of substitution on the stability of 3-deoxyanthocyanidins in aqueous solutions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, p. 531, 1983.

- TERAHARA, N., YAMAGUCHI, M., TAKEDA, K., et al. Anthocyanins acylated with malic acid in *Dianthus caryophyllus* and *D. deltoides*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1715-1717, 1986.
- THOMPSON, L.U., SERRAINO, M.R. Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and amino acid absorption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 468, 1986.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. Anthocyanins: Co-pigmentation with catechin and acetaldehyde. **J. Sci. Fd. Agric.**, v. 28, p. 539-544, 1977.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. Anthocyanins. In: Development in Food Colours I. **J. Walford. Applied Science**, London, p.151-187. 1980.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. **Nature**, v. 212, p. 158-159, 1966.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. The anthocyanins. In: HARBORNE, J.B. MABRY, T.J., MABRY, H. (Eds.) **The Flavonoids**. London, Champman & Hall Ltd., p. 215-266, 1975.
- TIMBERLAKE, C.F. The biological properties of anthocyanins. **Quarterly Information Bulletin**, NATCOL. n. 1, p. 4-15, 1988.
- TROLL, W., LIM, J.S., FRENKEL, K. Prevention of cancer by agents that suppress production of oxidants. In: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, M.T., et al. (Eds.) **Food Phytochemicals for Cancer Prevention I**, Cap. 27, 1994.
- TSUDA, T., OHSHIMA, K., KAWAKISHI, S. et al. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 248-251, 1994a.
- TSUDA, T., WATANABE, M., OHSHIMA, K. et al. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-o- β -d-glucoside and cyanidin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 2407-2410, 1994b.
- VALLE-VEGA, P, NIETO-VILLALOBOS, Z., ALVAREZ-RIOS, J., et al. Efectos del envejecimiento acelerado sobre factores antinutricionales en frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 10, n. 1, p. 1-22, 1990.
- VAN BUREN, J.P., ROBINSON, W.B. Formation of complexes between protein and tannic acid. **J. Agri. Food. Chem.**, v. 17, n. 4, p. 772-777, 1969.
- VIEIRA, C. Leguminosas de grãos: importância na agricultura e na alimentação humana. **Inf. Agrop.**, Belo Horizonte, v. 16, n. 174, p. 5-11, 1992.

- VILLANHUEVA, J.A., et al. Papel de los polifenoles en el bajo valor nutritivo de la *Vicia faba*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 37, n. 2, p. 324-32, 1987.
- WILLIAMS, M., HRAZDINA, G. Anthocyanins as food colorants: effect of pH on the formation of anthocyanin rutin complexes. **J. Food Sci.**, v. 44, p. 66-68, 1979.
- WILSON, K.A., LASKOWSKI, M.S.R. Isolation of three isoinhibitors of trypsin from garden bean, *Phaseolus vulgaris*, having either lysine or arginine at the reactive site. **J. Biol. Chem.**, v. 248, p. 756-762, 1973.
- WOLF, W.J. Legumes: seed composition and structure, processing into protein products and protein properties. In: WHITAKER, J.R., TANNENBAUM, S.R. (Eds.) **Food Proteins**. Avi Publishing Company, Inc. 1977. Cap. 10.
- WROLSTAD, R.E., STRUTHERS, B.J. Polyvinylpyrrolidone column chromatography of strawberry, rhuibarb and raspberry anthocyanins. **J. Chromatog.**, v. 55, p. 405-408, 1971.
- WU, C., WHITAKER, J.R. Homology among trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney bean, brazilian pink bean, lima bean and soybean. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1583-1589, 1991.
- WU, W., WILLIAMS, W.P., KUNKEL, M.E., et al. True protein digestibility and digestibility-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric Food Chem.**, v. 43, p. 1295-1298, 1995.
- ZIENA, H.M., YOUSSEF, M.M., EL-MAHDY, A.R. Amino acid composition and some antinutritional factors of cooked faba beans (medamnins): effects of cooking temperature and time. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1347-1349, 1991.
- ZULU, R.M., GRAYER, R.J., INGHAM, J.L., et al. Flavonoids from the roots of two *Rhynchosia* species used en the preparation of a Zambian beverage. **J. Sci. Food Agri.**, v. 65, p. 347-354, 1994.