

SOLANGE MARA BIGONHA

**QUALIDADE PROTEICA E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E ZINCO EM
FEIJÕES BIOFORTIFICADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T
B594q
2013
Bigonha, Solange Mara, 1975-
Qualidade proteica e biodisponibilidade de ferro e zinco em
feijões biofortificados / Solange Mara Bigonha. – Viçosa, MG,
2013.
xiv, 103f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Feijão. 2. Feijão - Qualidade. 3. Rato. 4. Alimentos -
Teor proteico. 5. Proteínas. 6. Ferro. 7. Zinco. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola. II. Título.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
CDD 22. ed. 633.372

SOLANGE MARA BIGONHA

**QUALIDADE PROTEICA E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E ZINCO EM
FEIJÕES BIOFORTIFICADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de Julho de 2013

Hercia Duarte Stampini Martino
(Coorientadora)

Virginia Ramos Pizziolo

Gilberto Simeone Henriques

Marliane de Cássia Soares da Silva

Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A minha mãe, pela plena dedicação e incentivo a minha vida. Aos meus filhos, Otto e Thaís, e ao meu esposo, Fernando, pelo amor, carinho, respeito, dedicação e paciência nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste curso.

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

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio e parceria.

À professora Maria Goreti de Almeida, pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança e pela amizade.

À professora Hércia Stampini Duarte Martino, pela orientação, incentivo, conselhos, carinho e, principalmente, pela amizade.

Aos membros da banca pela honra da presença e oportunidade de enriquecimento do trabalho.

Aos professores Márcia Rogéria de Almeida Lamego, Maria do Carmo Pelúzio, João Paulo Viana Leite e George Henrique de Moraes pelo grande incentivo e amizade.

Àos amigos e companheiros de trabalho José Maria, Marliane de Cassia Silva e Luciana Marques Cardoso, pela amizade, carinho, incentivo e respeito em todos os momentos.

As minhas amigas Marisa de Abreu, Glauce Dias, Claudia Lucia Pinto, Rita Lopes Stampini, pelo grande incentivo e amizade sempre.

Aos amigos Patricia Fontes, Anderson Barbosa e Elisa Muller, Bárbara, Christiane, pela enorme contribuição na minha tese e principalmente pela amizade sincera e uma feliz convivência.

A estagiária Stephane Castellar, pela grande ajuda no laboratório e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Celular, em especial Jefferson Dias, pelo feliz convívio, amizade e apoio nas análises no laboratório.

Ao secretário da pós-graduação, Eduardo Monteiro, pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

Aos técnicos do departamento de Zootecnia, Bioagro, Solos e Nutrição pela ajuda nas análises.

A todos os professores, funcionários, amigos e colegas do DBB, que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A Deus, por tudo...

BIOGRAFIA

Solange Mara Bigonha, filha de Antonia Barbosa Valente e Antonio Vallone Bigonha, nasceu em 1 de fevereiro de 1975, em Ubá, MG.

Em fevereiro de 1994 ingressou no Colégio de Aplicação (COLUNI), concluindo o ensino médio em dezembro de 1997.

Em abril de 2000 iniciou o Curso de Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Janeiro de 2005.

Em agosto de 2007 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em nível de mestrado pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Bioquímica e Metabolismo Animal.

Em Julho de 2009, submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

Em agosto de 2009 iniciou o programa de doutorado, na mesma instituição e Julho de 2013 submeteu a tese para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	4
1.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 História do feijão na nutrição humana	5
1.2 Composição química e valor nutritivo do feijão	7
1.3 Carboidratos do feijão	9
1.4 Proteínas do feijão	10
1.5 Outros componentes dos feijões	12
1.6 Qualidade Proteica	15
1.7 Biodisponibilidade Mineral	18
1.8 Propriedades Funcionais do Feijão	20
1.9 Proteína vegetal	22
1.10 Fibra Dietética	23
1.11 Compostos fenólicos	25
1.12 Fitato	26
1.13 Conclusão	28
1.14 Referências Bibliograficas	29
CAPÍTULO 1	35
QUALIDADE PROTEICA	35
1. Introdução	36
2. Material e Métodos	37
2.1 Análise da composição química dos feijões	37
2.3 Digestibilidade proteica in vivo	39
2.3.1 Dietas experimentais e ingredientes	39
2.3.2 Ensaio biológico	40
2.4 Análise estatística	42
3. Resultados e Discussão	43
4. Conclusão	51
5. Referências Bibliográficas	52
CAPÍTULO 2	55
FEIJÕES BIOFORTIFICADOS: BIODISPONIBILIDADE DE FERRO COMPARÁVEL AO FERROSO	55
RESUMO	55
1. Introdução	56

2. Material e Métodos	58
2.1. Cultivares de feijão	58
2.2. Preparo da farinha de feijão	59
2.3. Composição Química	59
2.4 Ensaio Biológico	62
2.4.1 Ética	62
2.4.2 Dietas	62
2.4.3. Delineamento experimental	63
2.4.4. Parametros Hematologicos	64
2.5. Analise Estatística	65
3. Resultados e Discussão	65
4. Conclusão:	75
5. Referências Bibliográficas	76
CAPÍTULO 3	81
BIODISPONIBILIDADE DE ZINCO E QUALIDADE FUNCIONAL DE FEIJÕES BIOFORTIFICADOS	81
RESUMO	81
1. Introdução	83
2. Material e Métodos	84
2.1. Cultivares de feijão	84
2.1.1 Preparo da farinha de feijão	84
2.1.2. Composição Química	85
2.2. Ensaio Biológico	86
2.2.1 Ética	86
2.2.2 Dietas	86
2.2.3 Delineamento experimental	87
2.2.4 Retenção mineral no Fêmur	88
2.3 Parâmetros bioquímicos	88
2.3.1 Zinco plasmático	88
2.3.2 Glicose	89
2.3.3 Colesterol Total	89
2.3.4 Colesterol HDL	89
2.3.5 Triacilglicerol	90
2.3.6 Alanina Amino Transferase (ALT)	90
2.3.6 Aspartato Amino Transferase (AST)	90
2.4 Análise Estatística	91

3. Resultado e Discussão	91
3.1. Desempenho Nutricional	91
3.2. Concentração de zinco no plasma	94
3.3. Concentração mineral no osso	96
3.3. Retenção mineral	97
3.5 Desenvolvimento ósseo	101
3.6 Qualidade Funcional do Feijão	103
4. Conclusão	105
5. Referências Bibliográficas	106

RESUMO

BIGONHA, Solange Mara, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Qualidade Proteica e Biodisponibilidade de Ferro e Zinco em Feijões Biofortificados.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino, Joel Antônio de Oliveira, Rodrigo Siqueira Batista e Christiano Vieira Pires.

Nesse trabalho, os feijões biofortificados com ferro e zinco BRS Pontal (variedade carioca) e BRS Agreste (variedade mulatinho) foram avaliados quanto à digestibilidade de sua proteína *in vivo*, ao perfil de aminoácidos e ao escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS). O PDCAAS é definido pela relação do conteúdo do primeiro aminoácido limitante na proteína em mg/g multiplicado pela digestibilidade verdadeira. O padrão de referência é a necessidade de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos de idade segundo a FAO/WHO, 1985. A qualidade da proteína é baseada no aminoácido essencial limitante, em que valores maiores que 1, tanto para o EQ como para o PDCAAS, indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades da dieta de humanos (Pire et al 2006; FAO/OMS 1985). O feijão BRS Pontal apresentou baixa digestibilidade proteica (67%) e um perfil aminoácídico deficiente em metionina e cisteína (aminoácidos sulfurados). A metionina é considerada um aminoácido limitante, por ser nutricionalmente essencial ao organismo humano. A cisteína, apesar de não constituir um aminoácido dispensável, tem a metionina como intermediário na sua biossíntese, tornando, assim, esse aminoácido tão limitante quanto á metionina. A qualidade proteica do feijão BRS Pontal foi considerada ruim, com um valor de PDCAA em torno de 47%. Esses resultados foram similares a muitas outras variedades de feijões estudadas em outros experimentos que trabalharam com feijões comuns cozidos. O Feijão BRS Agreste apresentou uma digestibilidade proteica (45%) inferior ao feijão BRS Pontal, porém seu perfil aminoácídico foi superior ao BRS Pontal e muitas outras variedades de feijão comuns estudadas. O Feijão BRS Agreste não apresentou aminoácidos limitantes e, portanto, não foi calculado seu valor de PDCAA. Esses resultados conferem ao feijão BRS Agreste uma falsa impressão que sua qualidade proteica foi superior. No entanto, essa é

uma limitação do método do PDCAAS que superestima o valor proteico dos alimentos. Quando comparada à digestibilidade das proteínas animais, a baixa digestibilidade das proteínas do feijão é um dos seus problemas nutricionais, pois, avaliada em diferentes experimentos com animais, situou-se entre 40% e 70% (Sgarbieri et al., 1979), sendo baixa em humanos, com cerca de 55% (Bressani, 1983). Os fatores antinutricionais presentes no feijão, como os fitatos e os polifenóis (taninos), podem afetar a qualidade proteica por se complexarem às proteínas, diminuindo a susceptibilidade à proteólise. Considerando que enzimas digestivas também são proteínas, os fitatos podem afetar, potencialmente, de forma adversa, a atividade enzimática por ligação direta com elas, provocando sua inativação enzimática. A biodisponibilidade de ferro e Zn dos Feijões biofortificados foi avaliada por meio de ensaios biológicos com ratos. O ganho de hemoglobina (GHb) e a eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE) de ratos anêmicos foram os principais parâmetros de quantificação da absorção e utilização do ferro presente nos feijões. O feijão BRS Pontal e o BRS Agreste apresentaram GHb semelhantes, mas não chegaram a atingir os valores do grupo que recebeu sulfato ferroso. Porém, quando se avaliou a HRE, não houve diferença entre os grupos que receberam feijões e o grupo que recebeu sulfato ferroso. Esses resultados confirmaram a eficiência do ferro presente nos feijões em recuperar a hemoglobina de ratos anêmicos. A razão molar fitato/ferro dos feijões foi inferior aos valores considerados prejudiciais para a biodisponibilidade de ferro. Concluiu-se que a biodisponibilidade de ferro dos feijões biofortificados foi comparável ao padrão sulfato ferroso. Para determinação da biodisponibilidade de zinco (Zn) utilizou-se como parâmetros o Zn plasmático e a retenção de Zn nos fêmures dos ratos. A retenção mineral no fêmur dos ratos foi calculada considerando a quantidade de mineral depositada no fêmur e a quantidade de mineral consumida durante o experimento. As dietas foram ajustadas para fornecer dois níveis de Zn (15 e 30 ppm) procedente do Carbonato de zinco ($ZnCO_3$) (dietas padrão) ou dos feijões biofortificados cozidos e secos (dietas teste). Não foi possível formular uma dieta com 30 ppm de Zn para o feijão BRS Agreste, pois, como este feijão tem um teor de Zn muito inferior ao BRS Pontal, a sua adição, para atingir o nível de 30ppm, iria desbalancear todos os outros macronutrientes. Não houve diferença na concentração do Zn

plasmático em nenhum dos grupos avaliados. No entanto, o aumento da ingestão de Zn na dieta dos animais diminuiu a retenção de Zn femural. Isto foi observado tanto nos grupos que receberam dietas padrão quanto nos grupos que receberam dietas com adição de feijão. Quando foi fornecida a mesma dose de Zn, porém com fontes diferentes, nas dietas padrão e com adição de feijão, a retenção de Zn foi menor na dieta contendo feijão. Esse comportamento foi observado nos dois níveis estudados (15 e 30 ppm). O teor de fitato presente nos feijões estudados foi suficiente para reduzir a biodisponibilidade de Zn nas dietas com adição de feijão, o que explicaria uma redução de 43% na retenção de Zn nos ossos dos animais alimentados com os feijões com 30 ppm de Zn, quando comparados ao grupo que recebeu dieta padrão sem adição de feijão. Porém, quando avaliamos a retenção de Zn nas dietas com 15 ppm de Zn não houve diferença entre os grupos, indicando que o aumento da quantidade de feijão na dieta foi o fator decisivo para a diminuição da retenção. A qualidade funcional do feijão foi avaliada pelas determinações de glicose, colesterol total, HDL, triglicerídeos, TGO e TGP sangüínea, nas quais não foi encontrada diferença estatística entre os grupos que receberam dieta padrão e os grupos que receberam dieta com diferentes concentrações de feijão. Concluiu-se, portanto, que quanto maior for a concentração de feijão na dieta, maior a concentração de fatores antinutricionais e, conseqüentemente, maior o prejuízo na retenção mineral de Zn. A biodisponibilidade de Zn dos feijões pode ser comparada á biodisponibilidade de carbonato de zinco nas dietas com concentrações de feijão de até 50% e 15 ppm de Zn. Acima dessas concentrações, houve prejuízo no desempenho e na retenção mineral no fêmur dos animais. Não houve relação entre a concentração de feijão e Zn na dieta e os parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil lipídico e glicêmico dos ratos.

ABSTRACT

BIGONHA, Solange Mara, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Protein Quality and Iron and Zinc Bioavailability of Beans Biofortified.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisers: Hércia Stampini Duarte Martino, Joel Antônio de Oliveira, Rodrigo Siqueira batista and Christiano Vieira Pires.

In this work, the beans biofortified with iron and zinc BRS Pontal (Carioca variety) and BRS Agreste (variety mulatto) were evaluated for their protein digestibility in vivo, the amino acid profile and chemical score corrected for protein digestibility (PDCAAS). The PDCAAS is defined as the ratio of the content of the first limiting amino acid in the protein in mg / g multiplied by the true digestibility. The reference standard is the need for essential amino acids for children 2-5 years old according to FAO / WHO, 1985. Protein quality is based on the limiting essential amino acid, wherein values greater than 1 for both the EQ PDCAAS as to indicate that the protein is of good quality, essences containing amino acids capable of meeting the dietary needs of humans (Pires et al 2006, FAO / WHO 1985). The BRS Pontal beans had low protein digestibility (67%) and a profile of the amino acids deficient in methionine and cysteine (sulfur amino acids). Methionine is considered a limiting amino acid for being nutritionally essential to the human body. The cysteine, although not form a dispensable amino acid, methionine is as an intermediate in their biosynthesis, thus making this amino acid such as methionine limiting. The quality of protein in beans BRS Pontal was considered poor, with a value of PDCAA around 47%. These results were similar to many other varieties of beans studied in other experiments that worked with common beans cooked. The Bean Wasteland BRS showed a protein digestibility (45%) lower than the beans BRS Pontal, however its amino acid profile was superior to BRS Pontal and many other bean varieties studied. The Bean BRS Agreste showed no limiting amino acids and therefore not calculated value of PDCAA. These results give the beans BRS Agreste quality protein than many other varieties studied by other researchers, and this is an important differentiator for new studies of this variety can be performed in order to obtain a cultivar with

improved protein digestibility. When compared to the digestibility of animal protein, low protein digestibility of beans is one of their nutritional problems, therefore, evaluated in different animal experiments, was between 40% and 70% (Sgarbieri et al., 1979), being low in humans, about 55% (Bressani, 1983). The antinutritional factors in beans, such as phytates and polyphenols (tannins), can affect the quality of protein is protein complexing, decreasing susceptibility to proteolysis. Whereas digestive enzymes are also proteins, phytates can affect potentially adversely, the enzyme activity by binding directly to them, causing their enzymatic inactivation. The bioavailability of iron and zinc biofortified beans was evaluated by means of biological assays in rats. The gain of hemoglobin (GHb) and hemoglobin regeneration efficiency (HRE) of anemic rats were the main parameters to quantify the uptake and utilization of the iron present in the beans. The beans BRS and BRS PontalWasteland GHb showed similar but have not reached the values of the group receiving iron. However, when we assessed the HRE, there was no difference between the groups receiving and beans group receiving iron. These results confirmed the efficiency of the iron present in the beans to recover hemoglobin in anemic rats. The molar ratio of phytate / iron beans was lower than the values considered harmful for bioavailability of iron. It was concluded that the bioavailability of iron beans biofortificados was comparable to the standard ferrous sulphate. To determine the bioavailability of zinc (Zn) are used as parameters plasma zinc and zinc retention in the femurs of rats. The mineral retention in the femur of rats was calculated considering the amount of mineral deposited in the femur and the amount of mineral consumed during the experiment. Diets were adjusted to provide two levels of Zn (15 and 30 ppm) coming from zinc carbonate ($ZnCO_3$) (standard diet) or cooked and dried beans biofortified (test diets). It was not possible to formulate a diet with 30 ppm Zn for beans BRS Agreste, because, as this bean has a Zn content much lower than BRS Pontal, their addition, to achieve the level of 30ppm, would unbalance all other macronutrients . There was no difference in plasma concentration of Zn in the groups assessed. However, increased intake of zinc in the diet reduced the retained femoral Zn. This was observed in both groups receiving standard diets as in the groups receiving diets with added beans. When the same dose was given Zn but with different sources, and the standard diets with added beans,

Zn retention was lower in the diets containing beans. This behavior was observed at both levels studied (15 and 30 ppm). The amount of phytate present in the beans was studied sufficient to reduce the bioavailability of zinc in the diet with added beans, which brings about a 43% reduction in retention of Zn in the bones of animals fed beans with 30 ppm Zn in compared to the group that received standard diet without adding beans. However, when we evaluate the retention of Zn in diets with 15 ppm of Zn did not differ between groups, indicating that increasing the amount of beans in the diet was the deciding factor for the decrease in retention. The functional quality of beans was evaluated by determination of glucose, total cholesterol, HDL, triglycerides, TGO and TGP blood, in which there was no statistical difference between the groups who received standard diet groups fed diet containing different concentrations of beans. It was concluded therefore that the greater the concentration of the bean diet, the higher the concentration of antinutritional factors and hence the greater the loss in retention of mineral zinc. The bioavailability of Zn beans can be compared to the bioavailability of zinc carbonate concentrations in the diet of beans 50% and 15 ppm zinc. Above these concentrations, there was impairment in performance and mineral retention in the femur of the animals. There was no relationship between the concentration of zinc in the diet and beans and biochemical parameters related to lipids and glucose levels of the mice.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. História do feijão na nutrição humana

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre os alimentos mais antigos, remontando aos primeiros registros da história humana. Achados arqueológicos indicam a existência de grãos domesticados há cerca de 10.000 anos a.C. Na verdade, as ruínas da antiga Troia fornecem evidências de que o feijão foi o alimento básico preferido por seus guerreiros (CONAB, 2010).

A maioria dos historiadores atribui às guerras a propagação do feijão por todo o mundo, uma vez que, o grão era o componente fundamental da dieta dos guerreiros. Naturalmente, os grandes exploradores ajudaram a expandir o uso e o cultivo de feijão para as regiões mais remotas do planeta. Atualmente, essa leguminosa é amplamente consumida no México, na América Central, na América do Sul e nos países africanos (CONAB, 2010).

O feijão é um dos produtos agrícolas mais econômica e socialmente significativos, no Brasil, e figura como alimento característico da dieta brasileira. Sete em cada dez brasileiros consomem feijão diariamente. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão e 3,6 milhões de toneladas de feijão foram produzidas na safra de 2011/2012. Além disso, destaca-se como o maior consumidor, respondendo por 20,4% do consumo total do mundo (CONAB, 2010). Outros legumes, como a lentilha e a soja, representam menos de 1% do consumo total de leguminosas (POF, 2010), confirmando a preferência brasileira pelo feijão.

A alta taxa de consumo de feijão no Brasil é, em grande parte, devida à situação social, econômica e cultural do gênero alimentício, bem como a sua importância tradicional nos hábitos alimentares do povo brasileiro (Ramos et al., 2002). O consumo médio diário de feijão cozido no Brasil é de 183,0 g / dia, com 177,9 g / dia, a média de consumo entre a população urbana e 208,1 g / dia, a média de consumo entre a população rural (Brasil, 2012 a).

A família **Fabaceae** ou **Leguminosae** compreende todas as espécies conhecidas, sendo *Phaseolus vulgaris* L. (o feijão comum), a mais

comumente encontrada. Há cerca de 40 espécies dos Gêneros ***Phaseolus***, ***Vigna*** e ***Vicia***, produzidos e consumidos no Brasil, dentre os quais os de feijão comum Carioca, Preto, Roxo e Mulatinho; os de *feijão* caupi e o de *feijão* fava, respectivamente ***Phaseolus vulgaris***, ***Vigna spp*** e ***Vicia spp.***, são os mais amplamente distribuídos (Mesquita et al., 2007). O cultivar Carioca é o mais aceito em todo o Brasil e compreende 52% da área cultivada de feijão no país. O feijão preto cresceu em 21% da área de produção do feijão, e é mais frequentemente consumido nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. O *feijão* caupi é o mais consumido no norte e nordeste e corresponde a 9,5% da área cultivada. No resto do Brasil, o grão tem pouco ou nenhum valor comercial ou aceitação (Brasil, 2010 b).

Recentemente, o cultivo comercial do feijão geneticamente modificado (GM), desenvolvido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), foi aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Esses cultivares transgênicos são o resultado de mais de dez anos de pesquisas realizados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF) e Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia, GO). Os novos cultivares, chamados EMBRAPA 5.1, têm vantagens econômicas e ambientais, que incluem maiores rendimentos, aumento da produtividade e minimização da necessidade de produtos químicos, que podem ser prejudiciais para o meio ambiente (Brasil, 2010 b). Os programas de melhoramento genético sempre enfatizaram o aumento da produtividade da planta e a resistência ao ataque de pragas. No entanto, atualmente, os métodos de melhoramento são utilizados também para melhorar a qualidade nutricional de culturas alimentares, permitindo o desenvolvimento de cultivares ricos em vitaminas e minerais essenciais para o metabolismo humano.

O desenvolvimento de feijão biofortificado com minerais é um exemplo importante da evolução do melhoramento genético. Indo além dos avanços que signifiquem simplesmente melhorar a eficiência e a economia da produção agrícola, as inovações buscam aumentar a qualidade nutricional dos alimentos, como os teores de ferro e de Zn (Welch et al.,

2000). Essa estratégia pode ser uma alternativa eficaz para aumentar a oferta de alimentos capazes de reduzir as deficiências de micronutrientes em populações de baixa renda, especialmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a ocorrência de anemia por deficiência de ferro afeta cerca de 50% da população (Jordão et al., 2009). Assim, o uso diário desses cultivares para consumo humano, como parte de uma dieta equilibrada, pode ajudar a melhorar a saúde, a prevenir ou a minimizar várias doenças crônicas (Ribeiro et al., 2010).

1.2. Composição química e valor nutritivo do feijão

O grão consiste geralmente em **tegumento**, que compreende, aproximadamente, 9% de matéria seca; **cotilédones**, 90%, e **eixo embrionário**, 1% (Lajolo et al., 1996). Os diversos cultivares de feijão podem ter a pele e cores do revestimento diferentes (branco, amarelo, preto, marrom escuro, vermelho, verde, cinza azulado, dentre outros), que podem ser usados para a classificação dos grãos (Figura 1). Atualmente, no Brasil, os grãos são classificados em três classes: branco (subclasses: brancão, branco, dentre outros), preto (subclasses: *cranberry*, amarelo, mulato, canapu, *evergreen*, dentre outros), carioca, e mista (MAPA, 2002).



Black class, *Ouro Negro* cultivar ; Color Class, *Mulato* cultivar; *Carioca* class, *Carioca* lineage;



White class, *Ouro Branco* cultivar; Color class, *Carnaval-MG* cultivar; Color class, *Ouro vermelho* cultivar;

Figura 1 - Características físicas dos cultivares de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados no Brasil.

Assim como as características físicas, a composição química de cultivares de feijão varia amplamente. No Brasil, certos cultivares apresentam de 15 a 30% de proteínas, 60 a 70% de carboidratos totais, e de 0,7 a 2% de lipídios. Essa composição varia de acordo com o cultivar, a safra, a

localização geográfica e o estresse ambiental (Pires et al., 2006; Bonett, et al., 2007; Costa e Rosa, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados no Brasil (g/100g peso seco)

Composição	Cultivares					
	Vermelho	Rajado	Carioca	Preto	Roxinho	Mulatinho
Proteína	23.2	23.8	23.5	26.1	25.6	20.2
Carboidrato	74.5	70.7	67.2	70.9	45.7	74.9
Lípidios	1.4	1.8	1.5	2.3	2.3	1.0
Cinzas	3.7	3.7	4.2	4.3	4.9	3.8
Fibra Diet Tot	22.5	25.2	25.8	26.1	21.5	25.2
Fibra Solúvel	3.9	4.5	7.9	5.7	4.9	3.7
Fibra Insolúvel	18.8	20.7	17.9	24.6	21.7	21.6

(Antunes, Bilhalva et al. 1995, Mendez, Fernandes et al. 1995, Pires, Ramirez-Cárdenas, Leonel et al. 2008, Silva, Rocha et al. 2009).

Essa leguminosa é a principal fonte de proteínas, minerais, vitaminas e fibras dietéticas para muitas pessoas, em função do seu baixo custo. Tem potencial para satisfazer de 10 a 20% da quantidade diária recomendada de certos nutrientes, para adultos. O feijão é consumido por todas as classes sociais, especialmente por aqueles de baixo nível socioeconômico, para os quais fornece uma porção substancial da alimentação diária.

O teor de lipídios do feijão é muito baixo, variando de 0,8 a 2,32% (Geil e Anderson, 1994; Ramirez-Cárdenas et al., 2008;). Lipídios neutros (triglicerídios, ácidos graxos livres, esteróis e ésteres de esteróis) compõem a classe predominante (de 30 a 40%) do total de lipídios. O feijão apresenta um perfil de ácidos graxos altamente variáveis, que inclui, geralmente, uma quantidade substancial de ácidos graxos insaturados (Reyes-Moreno et al., 1993). Em alguns cultivares, os ácidos graxos insaturados representam de 65 a 87% dos lipídios totais, com ácido α -linolênico (37 a 54%), ácido linoleico (21 a 28%) e ácido oleico (7 a 10%) predominantes (Chiaradia e Gomes, 1997). Também estão presentes os ácidos gordos saturados, tais como ácido palmítico, os quais correspondem de 10 a 15% dos lipídios totais (Pires et al., 2005).

O feijão é uma boa fonte de vitaminas solúveis em água, especialmente tiamina (0,86- a 1,14 mg/100 g), riboflavina (0,136 a 0,266

mg/100 g), niacina (1,16 a 2,68 mg/100 g), piridoxina (0,336 a 0,636 mg / 100 g) e ácido fólico (0,171 a 0,579 mg/100 g); no entanto, é fonte pobre em vitaminas lipossolúveis e em ácido ascórbico (Geil e Anderson, 1994;).

1.3. Carboidratos do feijão

O teor de hidratos de carbono em vários cultivares de feijão varia de 40 a 70%. O amido é o hidrato de carbono principal e pode variar entre os cultivares (Costa de Oliveira et al., 2001). Além de amido, feijões contêm carboidratos não digeríveis, dentre os quais se destacam a fibra (pectina, goma e mucilagem, celulose e hemicelulose) e derivados α -galactose de sacarose (rafinose, estaquiose e verbascose). Em alguns cultivares de feijões no Brasil, o teor de fibra dietética pode variar de 15 a 39,39% (Londero et al., 2008; Ramírez-Cárdenas et al., 2008). O cultivar carioca cozido, por exemplo, contém cerca de 9% de celulose, 0,46% de hemicelulose, 1,65% de lignina, 0,81% de pectina, 5,78% protopectina, e menos do que 0,5% de substâncias fenólicas (Mendes et al., 1995).

O conteúdo dos derivados de α -galactosilo de sacarose em grãos crus também varia, consideravelmente, entre diferentes cultivares. Esses derivados têm sido observados em quantidades entre 0,3 e 14,1 mg de rafinose, 2,7 e 3,0 mg de estaquiose, e 0,1 e 38,5 mg de verbascose por g de grão (Díaz-Batalla et al., 2006; Campos-Veja et al., 2009). Entre o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), as variedades pretas e roxas contêm uma menor quantidade de α -galactosídeos. Em feijão branco, bem como os feijões dos tipos *navy*, rim, tremoço e Lima feijão, a rafinose é o principal oligossacarídeo que tem como efeito a flatulência (Naczki et al., 1997).

A ausência da enzima α -galactosidase (EC. 3.2.1.22), responsável pela clivagem da porção terminal do α -galactosídeo, leva à acumulação de oligossacarídeos não digeríveis na parte inferior do intestino (Costa de Oliveira et al., 2001). Assim, a rafinose, a estaquiose e a verbascose são fermentados pela flora intestinal, produzindo gases (dióxido de carbono, hidrogênio e metano) que, mediante a acumulação no intestino, podem causar efeitos adversos, tais como distensão abdominal, flatulência e diarreia (Peyrin-Biroulet e Bigard, 2005).

Os efeitos adversos provocados pelos oligossacarídeos não digeríveis podem ser minimizados por meio de técnicas adequadas de preparação de alimentos dietéticos, tais como imersão, germinação, tratamentos com radiação gama, ou galactosidase, a partir de bactérias ou plantas exógenas, que podem reduzir o teor de oligossacarídeos não digeríveis (Guimarães et al., 2001; Machaiah e Pednekar, 2002). Esses oligossacarídeos podem ser reduzidos de 31 a 43%, quando as leguminosas são embebidas em água durante 12 h., de 44 a 50%, quando os grãos são cozidos (97 °C durante 35 min., proporção leguminosas: água 1:3 (p/v), e de 47 a 62%, quando os dois métodos são combinados (imersão em água e cozimento) (Shimelis e Rakshit, 2007).

1.4. Proteínas do feijão

Os diferentes cultivares de feijão têm alto teor de proteínas (15 a 35%), que são fortemente influenciados pela expressão gênica (que modula a síntese e acúmulo de frações específicas de proteínas) e por fatores ambientais, tais como localização geográfica e sazonalidades.

As principais proteínas dos feijões são as globulinas (54-79%) e as albuminas (12 a 30%). Em contraste com outras leguminosas, feijões comuns contêm quantidades elevadas de glutelina (20 a 30%) (Ma e Bliss, 1978; Del Pino e Lajolo, 2003). Faseolina é uma glicoproteína trimérica 7S (globulina) que representa cerca de metade do teor total de proteínas do feijão comum, enquanto a outra fração de globulina (11S) representa apenas 10% (Ma e Bliss, 1978; Carbonaro, 2006). Algumas variedades de grãos podem conter até 11 diferentes variações de faseolinas, que consistem em duas a seis subunidades (Imanowicz, 2001), com um peso molecular específico para cada subunidade, variando de 54,7 a 41,1 kDa. Aquelas com três e quatro subunidades são responsáveis por quase 75% do total de faseolinas (Montoya, et al., 2008).

Além disso, o feijão contém várias proteases e inibidores de α -amilase, lectinas e enzimas (tais como a lipoxigenase). Os inibidores de protease (Kunitz tripsina e inibidor de tripsina e quimotripsina Browman-Birk) constituem apenas 2,5% do conteúdo total de proteínas de feijão; no

entanto, elas contribuem com aproximadamente 40% da cisteína total de proteínas das sementes (Chiaradia e Gomes, 1997). O teor de inibidores de protease em feijões depende do genótipo, do local de crescimento e das condições ambientais. Em cinco variedades de feijões cultivadas no México, o teor do inibidor de tripsina (TI) variou de 6,3 a 14,5 Unidades de TI mg^{-1} de feijão (De Mejía et al. 2003). Entretanto, em 21 variedades brasileiras, o teor de Ti era maior do que o observado nas cinco variedades do México (59,93 a 151,07 Unidades de TI mg^{-1} de feijão) (Mesquita et al., 2007). Alonso e colaboradores (2000), observaram 3,97 Unidade de inibidor de quimotripsina mg^{-1} de grãos secos, em feijão *Athropurpurea*, cultivado na Espanha. Os Inibidores de proteases, bem como outros compostos presentes em grãos com um potencial antinutricional ativo, são sensíveis a determinadas técnicas de processamento e podem ser reduzidos até concentrações insignificantes, depois do cozimento em água (Carbonaro et al., 2000).

Os inibidores de amilase encontrados nos grãos são ativos contra α -amilase produzida pela fase larval de insetos, e, assim, desempenham um papel importante na proteção fisiológica contra o ataque de insetos. Estes inibidores também são capazes de inibir amilase salivar humana e do pâncreas. Por causa de sua especificidade, o inibidor de α -amilase do feijão é considerado um antinutriente na alimentação humana (Yamada et al., 2001). A atividade do inibidor de α -amilase é expressa em percentagem de atividade residual de α -amilase, ensaiada na presença de extratos de diferentes amostras de alimentos. Em diferentes cultivares de feijão, foram relatadas atividades de inibição que vão de 39,4 a 89,9% (Doria, et al., 2012).

As lectinas podem interferir no metabolismo de animais e no do homem. Elas têm a capacidade de se ligar a receptores específicos no epitélio intestinal; esta interação interfere na absorção e utilização de nutrientes, provocando mau desempenho no desenvolvimento dos animais (Ritt, 2005). O teor de lectina em grãos varia de 6 a 12% das suas proteínas totais (Sgarbieri, 1979), e, em alguns cultivares, pode ser de duas a três vezes superior ao observado em soja (De Mejía et al., 2003). Tem sido demonstrado que a concentração de lectina do feijão pode ser

influenciada pela região de cultivo e pelo cultivar de feijão, variando de 0,42 a 8,89 unidades de atividade de hemaglutinina / g de feijão (Barampama e Simard, 1993; De Mejía et al., 2003). Em geral, a maior parte do conteúdo de lectina é quase 100% inativada durante os processos de aquecimento doméstico (Carbonaro et al., 2000). Outros tratamentos, tais como a extrusão e autoclavagem, também são eficazes na redução da atividade de hemaglutinação (Alonso et al., 2000; Marzo, et al., 2002).

Tem sido relatado que os grãos contêm duas isoenzimas da lipoxigenase, identificadas como A e B. Ambas as proteínas têm um peso molecular de 100.000, contêm um átomo de ferro e parecem ser compostas por uma única cadeia de peptídeo (Hurt e Axelrod, 1997) . Elas catalisam a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, tais como linoleico (18:2) e α -linolênico (18:3), para produzir hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados (Liavonchanka e Feussner, 2006). Apesar do potencial de alterar o valor nutricional do feijão, a atividade da lipoxigenase pode ser reduzida a níveis residuais (16%) por meio da fervura dos grãos, em água, durante 15 min, a 60 ° C, ou por 5 min, a 70 °C (Akyol,et al., 2006).

1.4. Minerais – Ferro e Zinco

O ferro é um elemento essencial para o organismo humano por estar envolvido em diversos processos metabólicos vitais. Exerce importante papel na imunologia e processos catabólicos participando de sistemas enzimáticos e hormonais, assim como componentes funcionais da hemoglobina, presente nos eritrócitos, cuja função principal é o transporte de oxigênio permitindo assim como as reações de oxidação que liberam energia (...).O ferro é importante para a homeostase celular, devido principalmente a sua habilidade de aceitar e doar elétrons. Sua síntese é controlada por mecanismos enzimáticos e de degradação, tendo um controle rigoroso, uma vez que o excesso de ferro irá reagir com oxigênio formando radicais hidroxil e ânions superóxidos, que podem agir sobre proteínas, lipídeos e DNA, causando graves lesões celulares e teciduais.

A absorção do ferro ocorre na parte superior do epitélio duodenal e o transporte do lúmen intestinal até a circulação ocorre em três etapas: captação na membrana apical do enterócito, deslocamento intracelular e

transporte para o plasma³. Para que ocorra a absorção o do ferro inorgânico (Fe +2), forma encontrada nos alimentos de origem vegetal, é necessária a sua redução à forma ferrosa (Fe+3). A forma não heme do ferro (Fe inorganico) pode sofrer influencia de alguns fatores para sua absorção como, acidez, presença de agentes solubilizantes, minerais e fatores fitoquímicos¹. Os fitatos e polifenóis podem formar quelatos insolúveis com o ferro não heme reduzindo sua biodisponibilidade. O ferro heme, por sua vez, independe das condições do meio e da ação de fitoquímicos para sua absorção, sendo considerado, portanto, uma forma mais biodisponível. Após absorção do grupo heme na mucosa intestinal o ferro é liberado do anel porfirínico pela ação da heme-oxidase. O ferro então é transportado para o lúmen intestinal por uma glicoproteína plasmática denominada transferrina, que possui receptores celulares específicos para captação do ferro pelas células. O ferro penetra em compartimentos funcionais ou é armazenado pela ferritina. Todo o estoque de ferro encontra-se sob a forma de ferritina ou hemossiderina. Pode ser encontrado em todos os tecidos em especial no fígado, baço, medula óssea e músculo esquelético. A ferritina constitui um bom indicador das reservas de ferro no organismo. A excreção do ferro é mínima sendo eliminado pelo organismo pelas fezes, urina, menstruação e pequena quantidade pelo suor¹.

1.5. Outros componentes dos feijões

As isoflavonas são uma subclasse do grande grupo chamado flavonoides, cujo consumo, por sua modulação da atividade de estrogênio (Cederroth e Nef, 2009), tem sido associado a um risco reduzido de doença cardiovascular e de desenvolvimento do cancro, particularmente, nas mamas e na próstata (Setchell, 1998; Mathers, et al., 2000). Nos grãos crus, a principal isoflavona é genisteína (0-129,1 mg / g), seguida da daidzeína (0 a 9,7 mg / g) (Díaz-Batalla et al., 2006; Doria, et al., 2012) (Tabela II). Além destas isoflavonas, a presença de coumestrol (2,6 a 9,7 mg / g), um fitoquímico que também afeta os processos estrogênicos, tem sido observada (Díaz-Batalla et al., 2006).

Os ácidos fenólicos presentes em alimentos, incluindo feijão, podem ser divididos em duas classes: derivados de ácido benzoico (p-hidroxibenzoico, ácido vanílico e gálico) e derivados de ácido cinâmico (ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido cafeico). Em feijão, foi verificada a presença de ácido p-hidroxibenzoico (5,7-13,8 ug / g), ácido vanílico (5,2-16,6 ug / g), ácido p-cumárico (3,2-6,8 ug / g) e ácido ferúlico (17,0-36,0 jig / g) (Díaz-Batalla et al., 2006).

Taninos são compostos encontrados na maioria das plantas e das raízes, que podem estar presentes na madeira, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes, e na seiva. Em feijão, os taninos estão localizados principalmente nas cascas e, em pequenas quantidades, nos cotilédones. Esses compostos estão presentes em quantidades que variam de 0,03 a 38,1 mg de equivalente de catequina / g de feijão seco (De Mejía et al. 2003; Shimelis e Rakshit, 2007; Ramírez-Cárdenas et al., 2008). Esse conteúdo está relacionado com a cor dos grãos e da espécie (Beninger e Hosfield, 2003). Sendo os taninos compostos hidrofílicos e termolábeis, quando o feijão é cozido em água (97 °C, 35 min) ocorre uma redução de até 30% do teor de tanino e, quando os grãos são imersos em água por duas horas, antes da cocção (97 °C, 35 minutos), há redução de até 70% (Shimelis e Rakshit, 2007; Ramírez-Cárdenas et al., 2008) (Tabela 2).

Tabela 2 - Conteúdo e redução dos níveis de tanino em cultivares de feijões em base seca (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados no Brasil e na Turquia.

Cultivares	mg de equivalente de catequina g ⁻¹	Redução apos cozimento (%)		
		CAM ¹	CSAM ²	CSM ³
<i>Ouro Branco</i>	0.03	74	76	68
<i>Diamante Negro</i>	0.61	69	71	64
<i>BRS Radiante</i>	1.82	81	82	80
<i>Pérola</i>	1.02	82	83	80
<i>Talismã</i>	0.94	82	83	81
<i>Dermason</i>	0.64	82	nd	73
<i>Horoz</i>	0.57	82	nd	73
<i>Çali</i>	0.72	81	nd	74

nd : não-determinado; ¹ Feijões macerados por 15h e cozidos com a água de maceração em panela de pressão doméstica (40 min.); ² Feijões macerados por 15h e cozidos sem a água de maceração em panela de pressão doméstica (40 min.); ³ Feijões cozidos sem maceração sob as mesmas condições citadas anteriormente. (Nergiz and Gökğöz 2007, Ramírez-Cárdenas, Leonel et al. 2008).

O ácido fítico, também conhecido como o fitato, hexafosfato de inositol (IP6), mio-inositol e fosfato de inositol, é a principal forma de reserva de fósforo em sementes de feijão e é essencial para a germinação da planta. Nos grãos crus, o teor de ácido fítico pode variar de 7,8 a 27,1 mg / g (Díaz-Batalla et al., 2006; Ramírez-Cárdenas et al., 2008; Shimelis e Rakshit, 2007; Anton, et al., 2008). Destes, 81 a 89% corresponde à forma de hexafosfato de mioinositol (IP6) (Ramírez-Cárdenas et al., 2008) e 26-53% está localizado no tegumento (Anton, et al., 2008). Apenas IP6 e IP5 exercem um efeito negativo sobre a biodisponibilidade de minerais. Os outros compostos formados tais, como IP4 e IP3, têm baixa capacidade de ligação a minerais ou complexos formados por ligação são mais solúveis. Além disso, esses compostos de ácido fítico podem apresentar propriedades antioxidantes (Domínguez, et al., 2008; Martino et al., 2007; Andrade et al., 2010).

Durante o processamento, o armazenamento, a fermentação, a germinação e a digestão do feijão, o IP6 pode ser desfosforilado para produzir compostos como pentafosfato (IP5), tetrafosfato (IP4), trifosfato (IP3) e difosfato, possivelmente inositol (IP2) e monofosfato (IP1), pela ação de fitases endógenas (Domínguez et al., 2002; Chiplonkar e Agte, 2005; Shimelis e Rakshit, 2007; Ramírez-Cárdenas et al., 2008). O conteúdo de ácido fítico dos grãos pode ser reduzido por meio do processamento (Ramírez-Cárdenas et al., 2008). Essa redução do ácido fítico pode ser observada, após a imersão dos grãos, durante 12 h, para 19%, e para 65%, após imersão em água (2 h), seguida de cozimento (97 °C, 35 min) (Shimelis e Rakshit, 2007) (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito dos metodos de processamento nos niveis de acido fitico de tres cultivares de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) (mg g⁻¹ feijão seco)

Tratamento	Cultivares Awash		Cultivares Beshbesh		Cultivares Roba	
	Acido fitico	Redução (%)	acido fitico	Redução (%)	Acido fitico	Redução (%)
Sementes não processadas (controle)	23.5		24.7		17.3	
Macerado por 12h em agua pura	19.3	18	20.0	17	14.1	19
Germinado por 24h	6.3	73	15.7	35	12.5	28
Cooking of un soaked seeds	17.6	25	17.3	28	12.8	26
Macerado + cozido	8.2	65	8.7	64	6.7	61
Macerado em bicarbonate de sódio + cozimento	8.5	64	8.9	63	6.8	61
Autoclaving of un soaked seeds	8.2	65	8.4	65	6.9	60
Imerso em (H2O) + autoclavado	8.0	66	8.4	65	6.6	62
Germinado por 24 h + autoclavado	0.6	98	1.3	95	0.4	98
Germinado por 48 h + autoclavado	nd	100	nd	100	nd	100

Adaptado com permissão da referencia (Shimelis and Rakshit 2007). Copyright © 2006 Elsevier Ltd.

1.6. Qualidade Proteica

Dentre a composição qualitativa e quantitativa dos aminoácidos dispensáveis, ou indispensáveis, a digestibilidade é parâmetro básico para se avaliar a qualidade das proteínas. De acordo com Blanco e Bressani (1991), a qualidade da proteína refere-se à sua capacidade de atender às necessidades nutricionais, do homem, de aminoácidos essenciais e o nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas.

As proteínas dos feijões contêm todos os aminoácidos essenciais, e são ricas em lisina. No entanto, contêm uma quantidade limitada de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) (Guzmán-Maldonado et al., 2000; Mbithi-Mwikya, et al., 2000; Pires et al., 2006) (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição de aminoácidos de cultivares de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados no Brasil, cozidos com água de imersão (g100g⁻¹ matéria seca)

Aminoácidos	Cultivares cozidos				Cultivares cru	
	Ouro Branco ¹	Diamante Negro ¹	BRS Radiante ¹	Talismã ¹	Peróla ²	Carioca ²
<i>Indispensáveis</i>						
Phenylalanine + Tyrosine	1.19	1.57	1.42	1.62	1.29	0.94
Histidine	0.39	0.36	0.37	0.44	0.58	0.44
Isoleucine	0.43	0.55	0.56	0.62	1.16	0.81
Leucine	0.84	1.15	1.16	1.20	1.77	1.30
Lysine	0.67	0.97	1.05	0.94	1.78	1.25
Metionine	0.20	0.24	0.22	0.27	0.26 ³	0.17 ³
Cysteine	nd	nd	nd	nd	-	-
Threonine	0.48	0.59	0.51	0.53	0.98	0.75
Tryptophan	nd	nd	Nd	nd	nd	nd.
Valine	0.56	0.64	0.64	0.72	1.30	0.91
<i>Total indispensável</i>	4.76	6.07	5.93	6.34	9.12	6.58
<i>Dispensáveis</i>						
Alanine	0.61	0.67	0.64	0.69	0.90	0.70
Arginine	0.80	0.79	0.7	0.93	2.06	1.60
Aspartic acid	1.70	1.75	1.66	1.78	3.80	2.77
Glutamic acid	2.15	2.12	1.99	2.26	4.29	3.15
Glycine	0.49	0.51	0.47	0.51	0.81	0.59
Proline	0.62	0.65	0.63	0.72	0.90	0.70
Serine	0.76	0.84	0.74	0.82	1.35	1.03
<i>Total dispensáveis</i>	7.13	7.33	6.83	7.71	14.11	10.55
<i>Total de aminoácidos</i>	11.89	13.40	12.76	14.05	23.22	17.13

¹ Feijões cozidos; ² Feijões cru; ³ metionina + cisteína; nd: não determinado. (Ribeiro et al., 2007; Ramirez-Cárdenas et al., 2008) .

Assim, é necessária a combinação de grãos e cereais (que são ricos em aminoácidos sulfurados), para atender às necessidades nutricionais humanas. Uma alternativa pode ser o desenvolvimento de novos cultivares de feijão, que atendam às recomendações de aminoácidos essenciais.

O método de digestibilidade da proteína corrigida pela pontuação de aminoácidos (PDCAAS) é recomendado como um método padrão para avaliar a qualidade das proteínas alimentares. A qualidade da proteína é baseada em aminoácidos essenciais limitantes em que os valores superiores a 1 indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de satisfazer às necessidades da dieta humana (Pires et al., 2006,). Em estudos que avaliaram diferentes cultivares brasileiros de feijão, o feijão cozido apresentou um PDCAAS intermediário (0,50-0,62) (Pires et al., 2006; Ramírez-Cárdenas et al., 2008) (Tabela 5). No entanto, é de se notar que, nesses estudos, os valores de PDCAAS podem ser subestimados porque apenas a metionina foi

quantificada e o padrão da FAO considera o valor de 25 mg / g de proteína para cisteína + metionina.

A qualidade nutricional da proteína do feijão é influenciada pela espécie botânica, pela variedade, pela concentração de compostos com propriedades antinutricionais ativas, pelo tempo de armazenamento e pelo tratamento térmico. Em geral, é mais baixa que a da proteína animal (Bressani, 1993; Cruz et al., 2003; Iqbal et al., 2003). A reduzida digestibilidade da proteína está associada à ação dos compostos antinutricionais ativos presentes na casca (taninos) e nos cotilédones (proteínas, taninos, fitatos) (Bressani, 1993). A digestibilidade *in vitro* da proteína variou entre 18,03 e 48,32%, em 21 cultivares, no Brasil (Mesquita et al., 2007).

A qualidade nutricional da proteína do feijão pode ser aumentada pelo processamento, especialmente por aquecimento úmido (Antunes et al., 1995; Shimelis e Rakshit, 2007). Em estudos *in vitro*, a maceração, por 12 h, ou o cozimento, por 1 h, sob pressão normal, aumenta a digestibilidade da proteína, em média, de 43,3 para 63,7%, em quatro variedades de feijão cultivadas, no Brasil (Antunes et al., 1995), e de 65,63 para 73,53%; 71,14 para 78,88% e 80,66 para 90,31%, em três variedades cultivadas na África Oriental. Em estudos *in vivo*, as proporções de eficiência proteica e de digestibilidade relativa de oito cultivares de feijão, no Brasil, fervidos em água, varia de uma média de 30,92 para 60,82% e de 67,2 para 93,97%, respectivamente (Costa de Oliveira et al., 2001; Cruz et al., 2003). A melhoria da digestibilidade *in vitro* da proteína de grãos pode ser atribuída não apenas à remoção ou redução dos antinutrientes, mas, também, à desestruturação da proteína nativa, incluindo os inibidores da enzima e lectinas, à solubilização individual dos oligossacarídeos e suas taxas de difusão, à atividade da fitase para quebrar o ácido fítico nas sementes e ao desenvolvimento da atividade de endógeno de α -galactosidase, para diminuir os oligossacarídeos (Shimelis e Rakshit, 2007).

1.7. Biodisponibilidade Mineral

Seis cultivares brasileiros de feijão apresentaram níveis relevantes de alguns minerais, como cálcio, Fe e Zn, para os quais o consumo da população em vulnerabilidade social é marginal (Tabela 5). Figura-se que os conteúdos de determinados minerais, em especial antioxidantes, ainda não tenham sido quantificados. O conteúdo mineral dos grãos pode ser reduzido durante o processamento, tal como a imersão, sozinha, e imersão seguida por cozimento (ElMaki et al., 2007).

Tabela 5 - Composição mineral de feijões cru (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados no Brasil (mg/100g de matéria seca)

Cultivares	Minerais						
	Fe	Ca	Mn	Mg	Cu	Zn	K
<i>Vermelho</i>	5.6	137.5	2.1	198.6	1.2	3.4	1492.5
<i>Rajado</i>	8.8	60.0	1.6	190.0	1.2	4.2	1510.0
<i>Carioca</i>	5.3	172.2	1.6	205.9	1.8	3.2	1332.5
<i>Preto</i>	5.4	174.2	1.9	214.1	2.7	3.2	1512.5
<i>Roxinho</i>	5.4	172.5	1.5	216.0	2.3	2.9	1362.5
<i>Mulatinho</i>	9.6	60.0	1.0	210.0	0.9	3.0	1200.5

(Pires et al., 2005; Mesquita et al., 2007; Ramírez-Cárdenas et al., 2008)

O melhoramento genético tem sido usado para melhorar a qualidade e quantidade de minerais do feijão. Feijão biofortificado parece ser um veículo promissor para aumentar a ingestão de Fe biodisponível, principalmente em populações que consomem esses grãos como alimento básico (Tako et al., 2011). Alguns cultivares de feijões, da coleção de germoplasma do Centro Internacional de Agricultura Tropical, da Colômbia, têm variabilidade genética suficiente para aumentar os teores de Fe e de Zn em 80 e 50%, respectivamente (Beebe et al., 2000). O uso de hidroponia, por exemplo, pode aumentar os teores de Fe e de Zn a 98 e 65%, respectivamente, o que conduz a uma redução de razões fitato / fitato e ferro / Zn em 38 e 46%, respectivamente (Donangelo et al., 2003).

Um aumento na concentração mineral, por si só, pode não refletir em aumento proporcional no teor mineral absorvido, a biodisponibilidade dos minerais também é modulada pela concentração de compostos inibidores ou potenciadores da absorção. Um estudo comparativo, com feijão vermelho, incluindo variedades andinas, convencionais (49 mg Fe / g; "Low Fé") e biofortificados (71 mg Fe / g; "High Fe"), utilizando um modelo animal, revelou a eficiência de manutenção de hemoglobina e valores

superiores de ferritina do fígado, no grupo tratado com os feijões biofortificados (Tako et al., 2011). No entanto, em estudo com mulheres com baixo *status* de Fe, que avaliou a absorção de Fe por meio da incorporação de eritrócitos de isótopos estáveis de ferro, constatou-se que, apesar dos níveis de polifenóis e da razão molar ácido fítico / ferro semelhantes, a absorção do Fe do feijão biofortificado foi 40% menor do que a do Fe do feijão convencional, resultando em quantidades iguais de Fe absorvido (Petry et al., 2012).

A biodisponibilidade também está relacionada com as características intrínsecas da matriz alimentar, como a cor de feijão, e com as extrínsecas, como o tipo de processamento (descascamento, imersão e cozimento). A biodisponibilidade de minerais nos grãos, especialmente do Fe, é maior no feijão branco, quando comparada com a dos grãos de cor clara (Hu et al., 2006 ; Lung'aho e Glahn, 2010; Tako e Glahn 2010) e é aumentada após a remoção da casca (Ghavidel e Prakash, 2007). Em ambos os casos, as diferenças na biodisponibilidade não eram devidas à razão molar de ferro / fitato, mas aos flavonoides nas cascas, especialmente na casca de cor, o que contribuiu para a baixa biodisponibilidade de minerais.

A imersão sozinha e a imersão seguida por métodos de preparação culinária contribuem para a liberação de minerais na forma livre, o que aumenta a extractibilidade em HCl, de Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Mn e Cu (ElMaki et al., 2007). A extractibilidade em HCl é um índice de biodisponibilidade de minerais. Assim, imersão em água, seguida por cozimento, pode ser considerada benéfica e uma técnica para melhorar a biodisponibilidade de minerais. Num estudo em animais, verificou-se que algumas variedades de feijão, quando cozidas, com ou sem água de maceração, apresentavam biodisponibilidade do Zn superior à do carbonato de Zn ($ZnCO_3$, dieta padrão). No entanto, os métodos de cozimento não afetaram de maneira uniforme a biodisponibilidade de diferentes variedades e isso foi atribuído às características intrínsecas da matéria-prima, especialmente a relação de Fitato: Ca/Zn. No mesmo estudo, a biodisponibilidade do Fe no cultivar Ouro Branco, após imersão em água seguida por cozimento, foi semelhante à do padrão sulfato ferroso ($FeSO_4$) (Ramírez-Cárdenas, 2006).

Os dados sugerem que o melhoramento genético, aumentando o teor de minerais ou diminuindo compostos que reduzem a biodisponibilidade desses minerais, ou a transformação (*peeling*, imersão, cozimento etc), podem não ser capazes de melhorar a biodisponibilidade de minerais. Assim, recomenda-se que as diferentes técnicas sejam combinadas, para melhorar a biodisponibilidade de minerais dos feijões.

1.8. Propriedades Funcionais do Feijão

As propriedades benéficas do feijão à saúde também são bem conhecidas, e, por causa da alta incidência de doenças crônicas, relacionadas com o estilo de vida, o feijão ganhou um novo *status* nas recomendações dietéticas. Historicamente, considerado um alimento de base, nos países em desenvolvimento, para impedir a fome, foi revisto, como um novo alimento funcional, para reduzir o risco de doenças, tais como doenças cardiovasculares, por suas propriedades de baixar o colesterol. Geil e Anderson (Geil e Anderson, 1994) relataram uma redução significativa, em lipídios no sangue, em pacientes que consumiram 75 a 200 g de feijão seco diariamente. Feijão cozido também foi relatado como redutor dos níveis totais de LDL-colesterol, em ratos hipercolesterolêmicos e em porcos, alimentados com dietas de alta gordura saturada, suplementadas com 1% de colesterol (Costa, 1992; Costa et al., 1994).

O potencial para a saúde, dos feijões brasileiros (*Phaseolus vulgaris* L.) foi demonstrado em ratos com hipercolesterolemia, alimentados com feijão preto, vermelho e carioca (cultivar Pinto), cujos níveis de colesterol total no sangue foram reduzidos em 16, 12 e 11%, respectivamente (Rosa et al., 1998). Os feijões pretos promoveram redução de 35% nos níveis de colesterol total no sangue, bem como uma maior excreção fecal de colesterol, em ratos com hipercolesterolemia (Rosa et al., 1998). Ramírez-Cárdenas, 2006 estudou os efeitos funcionais de cinco cultivares de feijão do Brasil sobre os lipídios do sangue e a glicose, em ratos adultos Wistar, hipercolesterolêmicos. O feijão preto (cultivar Diamante Negro) foi o mais eficaz na redução do colesterol e triglicerídeos, no sangue, e na deposição de lipídios no fígado. O HDL / colesterol total e a excreção fecal de lipídios

foram maiores nos animais alimentados com feijão preto em comparação com os de ratos alimentados com outros cultivares e dos grupos de controle (alimentados com gordura, dieta rica em sacarose). O feijão Pinto (cultivar BRS Radiante) foi mais eficaz na redução da glicose no sangue, enquanto o feijão branco (Ouro Branco cultivar) não mostrou nenhum efeito sobre os lipídios e glicose no sangue, maior deposição de lipídios no fígado e em menor excreção fecal de lipídios. Os outros cultivares de feijão Pinto (Pérola e Talismã) mostrou resultados mistos. As propriedades funcionais desses cultivares de feijão foram significativamente relacionadas com a sua fibra e teor de tanino, mas não apresentou correlação com conteúdo de fitato e de ácidos aminados.

O estudo de Birketvedt e colaboradores (2002) com 62 indivíduos com sobrepeso e obesos, consumindo dietas suplementadas com extratos de feijão (feijão branco, misturado com alfarroba), apresentaram redução de 6% em seu colesterol total, no sangue, em curto (três meses) e longo prazos (12 meses) de intervenções. Winham e colaboradores (2007) observaram efeito semelhante em 16 indivíduos com resistência moderada à insulina, em cujo sangue os níveis totais de colesterol LDL foram reduzidos em cerca de 8%, após oito semanas de consumo de feijão Pinto.

Os mecanismos de ação para explicar os efeitos hipocolesterolêmicos dos grãos não estão completamente elucidados, mas estão associados com os vários componentes das leguminosas (Mann et al., 2007), tais como proteína vegetal, fibras solúveis, saponinas, esteroides de plantas, polifenóis e fitato.

Os antinutrientes encontrados em leguminosas (inibidores da protease, lectinas, saponinas, polifenóis e fitato) são bem conhecidos para a redução do seu valor nutritivo, de suas digestibilidade e biodisponibilidade de minerais (Sandberg, 2002). Muitos desses compostos e dos seus produtos de hidrólise, no entanto, podem apresentar efeitos benéficos à saúde, baixando lipídios e glicose no sangue, quando fornecidos em baixos níveis na dieta. Os polifenóis, fitatos, inibidores de protease, saponinas, lignanos e esteróis de plantas também estão associados com a redução do risco de diversos tipos de cancro (Shahidi, 1997).

Os efeitos indesejáveis da ingestão de feijão, causados pela flatulência derivada da fermentação de derivados de α -galactosilo, tais como a rafinose, a estaquiose e a verbascose, podem ser um dos fatores responsáveis para se evitar o feijão como parte da dieta, para muitas pessoas. O processamento de alimentos, para reduzir as causas da flatulência de legumes e para melhorar os componentes bioativos é uma estratégia promissora, para aumentar os benefícios saudáveis de consumo de feijão e, posteriormente, a comercialização de alimentos funcionais. Algumas patentes foram registradas e muitas outras podem ser no futuro, o que certamente contribuirá para aumentar a ingestão de feijão ou de seus componentes e reduzir o risco de doença cardiovascular, diabetes *mellitus*, obesidade e câncer, quando consumido regularmente, em uma dieta saudável.

Os feijões são alimentos complexos, com grande potencial funcional, considerando-se que a sua composição apresenta vários componentes, cujos efeitos biológicos têm sido investigados separadamente: proteínas, fibras dietéticas, saponinas, esteróis, compostos fenólicos, inibidores da protease, inibidores da α -amilase, lectinas, derivados α -galactosilo de sacarose, fitatos.

1.9. Proteína vegetal

Vários estudos em animais e humanos mostraram os efeitos das proteínas de plantas de feijão, soja e outros legumes, na redução dos níveis de colesterol no sangue, em comparação com os efeitos das proteínas animais (Morita, et al., 1997). A maior parte desses estudos limitou-se à comparação entre duas proteínas bem conhecidas e facilmente isoladas, nomeadamente a caseína e a proteína de soja. Os mecanismos de ação, provavelmente, estão relacionados com a composição e o equilíbrio entre os aminoácidos essenciais e não essenciais (Shutler e Walker, 1987).

O estudo de Kritchevsky (Kritchevsky, 1979), na década de 1970, apontou o papel da relação lisina: arginina na gênese do processo de aterosclerose. A abundância relativa de lisina em proteínas animais pode

inibir a atividade de arginase no fígado, com aumento da disponibilidade de arginina para a síntese de apoproteína LDL.

1.10. Fibra Dietética

Evidências epidemiológicas indicam os efeitos benéficos de fibras dietéticas, na redução do risco de doença cardiovascular (CHD), por sua capacidade, para reduzir a concentração de lipídios no sangue, a pressão arterial, o peso corporal e a melhoria da tolerância à glicose, dentre outros (Rehman e Shah, 2004; Lairon, 2007). Os grãos são boas fontes de fibra dietética solúvel e insolúvel, fornecendo cerca de 20 a 30 g/100 g de matéria seca (Ramírez-Cárdenas, et al., 2008). A utilização do feijão na indústria alimentar, no entanto, é incipiente, embora o seu uso como fonte de fibra não fermentável tenha sido citado (Vervoort, 2011).

Os benefícios das fibras dietéticas têm sido demonstrado em estudos com animais, tal como se segue: a) fibras dietéticas promovem reduções significativas nos níveis de colesterol sérico total, b) fibras insolúveis (celulose, hemicelulose e alguns) têm pouco efeito sobre o colesterol total no soro, c) fibras solúveis (pectina, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses) exercem efeito hipocolesterolêmico significativo, d) a redução do colesterol do soro pode ser, ou não, seguida de redução do colesterol no fígado, na aorta e em outros tecidos, e) o principal efeito de redução do colesterol é observado para o LDL-colesterol, f), o HDL-colesterol pode ser reduzido, aumentado, ou não ter nenhum efeito. Com base nesses relatórios, alguns produtos têm sido desenvolvidos e patenteados, utilizando goma de guar e outras fibras formadoras de gel, para a redução do colesterol no soro (Day e Kuhrts, 1989).

A elevada viscosidade da fibra solúvel no intestino promove a redução pós-prandial de lipídios e de glicose (Tharanathan e Mahadevamma, 2003) e é mais eficaz do que a fibra insolúvel em reduzir a concentração total de LDL-colesterol (Tharanathan e Mahadevamma, 2003). O mecanismo do efeito hipocolesterolêmico da fibra solúvel pode ser parcialmente explicado por sua capacidade de absorver os sais biliares (Aller et al., 2004), que, por sua vez, tornam-se indisponíveis para

reabsorção. Como consequência, o colesterol sintetizado no fígado é canalizado para a síntese de novos ácidos biliares. Além disso, a indisponibilidade dos sais biliares para a formação de micelas no intestino reduz a absorção de colesterol (Cardoso et al., 2006). O volume da excreção fecal é aumentado pela ingestão de fibra solúvel (Tharanathan e Mahadevamma, 2003; Aller et al., 2004), bem como os sais biliares (Costa, 2003), esteróis e lipídios (Carbonaro et al., 2000) nas fezes. O esvaziamento gástrico mais lento e a alta viscosidade no lúmen reduzem o acesso das enzimas digestivas e, conseqüentemente, a digestão e absorção de lipídios (Guillon et al., 2000; Costa, 2003), melhorando a saciedade. O mecanismo preciso pelo qual os complexos de fibras solúveis com os ácidos biliares não estão completamente esclarecidos, embora as interações hidrofóbicas (grupos de fenol) e iônicas (ácidos urônicos) tenham sido propostas (Guillon et al., 2000). A associação de fibra solúvel para ciclodextrinas não digeríveis e os esteróis têm sido propostos para aumentar a capacidade de ligação do ácido biliar e, conseqüentemente, reduzir os níveis de colesterol e de colesterol LDL (Lewandowski et al., 2003).

A fibra solúvel é fermentada pela microbiota do cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente acetatos, propionatos e butiratos (SCFA). Os SCFA são absorvidos no intestino e transportados, através da veia porta, para o fígado, onde o propionato pode inibir a síntese de colesterol, como mostrado no estudo com ratos alimentados com farelo de aveia (Anderson, 1987).

Vários estudos indicam os benefícios da fibra solúvel para reduzir o colesterol no sangue e o seu potencial na manipulação dietética de hipercolesterolemia. Embora uma dieta de baixo teor de gordura reduza a concentração de colesterol no soro de cerca de 5 a 10%, a adição de alimentos ricos em fibras solúveis, incluindo feijão, pode promover a redução de 20 a 30% (Rosa et al., 1998; Anderson, 1987). A magnitude desse efeito é bastante importante, considerando-se que a redução de 1% no colesterol total reduz o risco de CHD, em cerca de 2% (Anderson et al., 1990).

As dietas ricas em fibras são também recomendadas para manipulação dietética do diabetes, por sua capacidade para reduzir níveis de glicose, em jejum e em pós-absorção. Os mecanismos dessa ação não estão completamente esclarecidos, embora, pareça estar relacionado com o efeito mecânico da fibra dietética, insolúvel no intestino, o que reduz o tempo de trânsito intestinal. Por outro lado, a elevada viscosidade da fibra solúvel retarda o esvaziamento gástrico e a digestão e absorção de glicose, o que reduz a sua concentração no sangue. A fibra solúvel também melhora a sensibilidade à insulina (Marlett et al., 2002), uma vez que, a AGCC, tal como acetato, proporciona uma fonte alternativa de insulina, independentemente de energia capaz de substituir a glicose (Costa, 2003). O butirato também desempenha um papel importante no controle do diabetes, melhorando o volume de urina e os níveis de glicose no sangue e urina em ratos diabéticos quimicamente induzidos (Kumar et al., 2002).

A adição de 98 a 145 g / dia de feijões secos é eficaz para melhorar o controle metabólico e exercer efeitos benéficos, a longo prazo, em diabéticos. O programa HCF (High Carbohydrate-High Fiber) recomenda a ingestão diária de meia xícara de feijão cozido, como fonte de fibra alimentar, em uma refeição planejada para diabéticos (Geil e Anderson, 1994).

1.11. Compostos fenólicos

Nagem e colaboradores (1994) relataram que quercitrina, isoquercitrina, formonometin, biochanina A, rutina e os flavonoides quercetina foram mais eficazes na redução de lipídios no soro, em ratos. Num outro estudo, verificou-se que o feijão, cultivado na China, mostrou ampla composição de fenólicos (catequina, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, vitexina, isovitexina, ácido sinápico, quercetina), com capacidade antioxidante e antidiabética potencial (Yao et al., 2012).

As isoflavonas são compostos fenólicos, do grupo dos flavonoides, os quais se encontram presentes, exclusivamente, em leguminosas, em particular nas espécies *Vicia* e *Phaseolus*. As isoflavonas são potencialmente anticancerígenas. Os primeiros estudos concentraram-se

na sua capacidade de reduzir o risco de câncer da mama, embora o efeito possa não estar relacionado com os mecanismos hormonais (Garrido et al., 2003)

A estrutura química da isoflavona é semelhante à dos hormônios esteroides e, portanto, apresenta atividade de estrogênio. Doses farmacológicas de estrogênio induzem a síntese de receptores de lipoproteínas hepáticas de ratos e um aumento da captação de VLDL e LDL no plasma. Possivelmente, as isoflavonas mostram efeito similar na redução dos níveis de lipoproteínas do plasma (Shutler et al., 1987).

Vários estudos clínicos indicam a capacidade das isoflavonas de reduzir a susceptibilidade dos lipídios à oxidação (Wiseman et al., 2000) e tem-se observado que elas podem apresentar efeitos semelhantes à digitalina, no relaxamento da artéria coronária (Garrido et al., 2003).

Taninos também têm sido relatados por apresentar efeito hipocolesterolêmico, em ratos alimentados com dieta rica em colesterol. Tebib et al. (1994) relataram que a adição de 1% de colesterol na dieta dos ratos aumentou os níveis de LDL e reduziu o HDL-colesterol, mas essas alterações foram prevenidas pela adição de 2% de taninos polimérico à dieta.

Os efeitos benéficos dos polifenóis têm contrariado suas propriedades antinutrientes (Sathe, 2002). Taninos e outros polifenóis vegetais (antocianinas e flavonoides) têm sido considerados como fatores de proteção contra o efeito dos radicais livres, em doenças como câncer e aterosclerose (Carbonaro, 2006). A inibição da peroxidação lipídica foi investigada, num estudo *in vitro*, com antocianinas isoladas de *Phaseolus vulgaris*. Os resultados mostraram uma forte atividade antioxidante, em sistemas de lipossomas, reduzindo a formação de malondialdeído induzida por irradiação UV (Tsuda et al., 1996).

1.12. Fitato

O fitato é normalmente referido na literatura como um agente quelante, capaz de reduzir a biodisponibilidade de minerais, em seres humanos e em animais. O complexo de Fe-Fitato, no entanto, pode ser

benéfico para a redução de radicais hidroxilas, na parte inferior do intestino. Outros efeitos positivos do fitato, na saúde humana, incluem a redução dos níveis de glicose e lipídios séricos e o risco de câncer de mama (Yonekura e Suzuki 1993).

Efeitos benéficos da baixa concentração de fitato são relatados na literatura, sobre o seu efeito de redução de lipídios (Yonekura e Suzuki 1993). Essa capacidade está relacionada com a capacidade de se ligar ao Zn, e, conseqüentemente, a razão Zn / Cu, que, por sua vez, reduz os níveis de colesterol no soro e o risco de CHD (Greiner e Konietzny, 2007). O fitato pode também reduzir a glicose e a insulina no soro e tal efeito hipoglicemiante pode reduzir a síntese de lipídios no fígado (Rickard e Thompson, 1997). Fitatos reduzem a absorção do amido, por uma diversidade de mecanismos. Eles inativam α -amilases, por ligação à própria enzima, fazendo um complexo com o Ca, que é necessário para estabilizar a enzima, e pode-se ligar ao amido, mudando o seu grau de gelatinização ou a acessibilidade às enzimas digestivas. O fitato afeta a resposta da glicose, diminuindo também o esvaziamento gástrico.

A propriedade anticâncer do fitato está associada a diferentes mecanismos de ação. Por exemplo, o complexo de Fe-Fitato reduz a formação de radicais livres, uma vez que, o Fe pode catalisar a peroxidação lipídica e evitar danos ao DNA. A relação Zn-Fitato pode reduzir a proliferação de células, uma vez que, o Zn é necessário para o DNA (Rickard e Thompson, 1997). Amido não digerido é fermentado, no intestino grosso, pela produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como o butirato, que têm propriedades anticarcinogênicas. A fermentação também reduz o pH, o que reduz a formação de compostos carcinogênicos, tais como os ácidos biliares e de amônio, por sua insolubilização e neutralização, respectivamente.

Estudos sobre o valor nutricional do feijão foram realizados, durante muitos anos, mas ainda faltam pesquisas sobre os teores de compostos menores, bem como estudos experimentais para verificar o potencial efeito de diferentes cultivares de feijão para modificar fatores de risco de doenças crônicas e para modular os mecanismos fisiopatológicos envolvidos.

1.13. Conclusão

O feijoeiro é uma cultura importante para a nutrição humana, especialmente em países em desenvolvimento. Dada a sua composição, o consumo de feijão proporciona inúmeros benefícios à saúde, como indicado na manipulação dietética de várias doenças, tais como doenças cardíacas, diabetes e câncer. Embora os mecanismos de ação de cada um dos componentes dos grãos não sejam completamente compreendidos, é provável que as ações sinérgicas de compostos bioativos do feijão forneçam um alimento com altas propriedades funcionais. Entre os componentes mais amplamente aceitos com propriedades funcionais estão às proteínas, as fibras solúveis, as saponinas, os esteróis, os polifenóis e os fitatos. Por outro lado, os fatores antinutricionais presentes em leguminosas, tais como os inibidores da protease, lectinas, saponinas, fitatos e polifenóis, são bem conhecidos para reduzir o seu valor nutritivo, a digestibilidade ou diminuir a biodisponibilidade de proteínas e sais minerais. Alguns nutrientes, entretanto, e seus produtos de hidrólise, podem, também, ter efeitos benéficos sobre a saúde, quando encontrados em pequenas quantidades na dieta. Apesar das variedades de feijão cultivadas e consumidas no Brasil e das evidências sobre o potencial funcional dessa leguminosa, há necessidade de se desenvolverem pesquisas para aprofundar o conhecimento sobre o valor nutricional e a modulação de fatores de risco, para as doenças crônicas e para garantir a segurança alimentar e nutricional.

1.14. Referencias Bibliográficas

AKIYAMA, T.; OGAWARA, H. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. In: TONY HUNTER, B. M. S. (Ed.). *Methods in Enzymology*: Academic Press, 1991. p. 362-370.

AKYOL, Ç. *et al.* Inactivation of peroxidase and lipoxygenase in carrots, green beans, and green peas by combination of high hydrostatic pressure and mild heat treatment. *European Food Research and Technology* [S.I.], v. 224, n. 2, p. 171-176, 2006.

ALLER, R. *et al.* Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in healthy subjects: a randomized clinical trial. *Diabetes research and clinical practice* [S.I.], v. 65, n. 1, p. 7-11, 2004.

ALONSO, R. *et al.* Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry* [S.I.], v. 68, n. 2, p. 159-165, 2000.

AMIGO, L. *et al.* Influence of different dietary constituents of beans (*Phaseolus vulgaris*) on serum and biliary lipids in the rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 486-490, 1992.

ANDERSON, J. W. Dietary fiber, lipids and atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology* [S.I.], v. 60, n. 12, p. G17-G22, 1987.

ANDERSON, J. W. *et al.* Serum lipid response of hypercholesterolemic men to single and divided doses of canned beans. *The American Journal of Clinical Nutrition* [S.I.], v. 51, n. 6, p. 1013-9, June 1, 1990 1990.

ANDRADE, G. F. *et al.* Tratamento térmico adequado proporciona melhoria da qualidade nutricional de farinhas de soja elaboradas a partir de novos cultivares destinados à alimentação humana. *Revista Instituto Adolfo Lutz* [S.I.], v. 69, n. 4, p. 541-548, 2010.

ANTON, A. A. *et al.* Effect of pre-dehulling treatments on some nutritional and physical properties of navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT - Food Science and Technology* [S.I.], v. 41, n. 5, p. 771-778, 2008.

ANTUNES, P. L. *et al.* Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2. *Revista Brasileira de Agrociência* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 12-18, 1995.

BANERJI, A. *et al.* Treatment with field bean protease inhibitor can effectively repress ethylnitrosourea (ENU)-induced neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. *Cancer Letters* [S.I.], v. 130, n. 1-2, p. 161-167, 1998.

BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chemistry* [S.I.], v. 47, n. 2, p. 159-167, 1993.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 51, n. 27, p. 7879-7883, 2003/12/01 2003.

BIRKETVEDT, G. S. *et al.* Dietary supplementation with bean extract improves lipid profile in overweight and obese subjects. *Nutrition* [S.I.], v. 18, n. 9, p. 729-733, 2002.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Phaseolus vulgaris*). . *Archivos Latinoamericano de Nutrición* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 38-51, 1991.

BONETT, L. P. *et al.* Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). . *Arq. Ciênc. Saúde Unipar* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 235-246, 2007.

BRASIL. *Portaria no 85, de 06 de março de 2002*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2002

_____. *Boletim Técnico: Biotecnologia Agropecuária*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p.73. 2010a. (0103-0582)

_____. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008- 2009*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010b. (0031-9422)

_____. *Perfil do feijão no Brasil*. v. 2012. n. 21/03/2012: Ministério da Agricultura, 2012.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans. *Food Reviews International* [S.I.], v. 9, n. 2, p. 237-297, 1993/05/01 1993.

CAMPOS-VEGA, R. *et al.* Chemical Composition and In Vitro Polysaccharide Fermentation of Different Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science* [S.I.], v. 74, n. 7, p. T59-T65, 2009.

CARBONARO, M. 7S Globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of Structural Aspects on the Nutritional Quality. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [S.I.], v. 70, n. 11, p. 2620-2626, 2006.

CARBONARO, M. *et al.* Perspectives into Factors Limiting in Vivo Digestion of Legume Proteins: Antinutritional Compounds or Storage Proteins? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 742-749, 2000/03/01 2000.

CARDOSO, S. M. G. *et al.* Hipercolesterolemia e produção de radicais livres: efeitos protetores das fibras alimentares. *Nutrire* [S.I.], v. 31, p. 123-134, 2006.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology* [S.I.], v. 304, n. 1-2, p. 30-42, 2009.

CHIARADIA, A. C.; GOMES, J. C. *Feijão: química, nutrição e tecnologia*. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1997.

CHIPLONKAR, S.; AGTE, V. Predicting Bioavailable Zinc from Lower Phytate Forms, Folic Acid and Their Interactions with Zinc in Vegetarian Meals. *Journal of the American College of Nutrition* [S.I.], v. 25, p. 26-33, 2005.

CONAB. Indicadores Agropecuários. Balança Comercial do Agronegócio. Balança Importação. v. 2012. n. 23 march2012.

COSTA DE OLIVEIRA, A. *et al.* O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* [S.I.], v. 51, p. 276-283, 2001.

COSTA, N. M. B. *Investigation into the cholesterol lowering property of baked beans (Phaseolus vulgaris)*. (1992). 200 f. (PhD University of Reading), University of Reading, Reading, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233302000061>>

_____. Alimentos: Componentes Nutricionais e Funcionais. In: COSTA, N. M. B.; BORÉM, A. (Ed.). *Toxicology in Vitro*. Brasil: Nobel, 2003. p. 31-69.

COSTA, N. M. B. *et al.* Effect of beaked beans (*Phaseolus vulgaris*) on steroid metabolism and non-starch polysaccharide output of hypercholesterolaemic pigs with or without an ileo-rectal anastomosis. *Brit J Nutr* [S.I.], v. 70, p. 871-886, 1994.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. *Alimentos Funcionais – Benefícios para a saúde*. Viçosa: Produção Independente, 2008.

CRUZ, G. A. D. R. *et al.* Protein quality and in vivo digestibility of different varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Braz. J. Food Technol* [S.I.], v. 6, n. 2, p. 157-162, 2003.

DAY, C. E.; KUHRTS, H. *Method and composition for reducing serum cholesterol*. n. 0887-2333, 1989.

DE MEJÍA, E. G. *et al.* Effect of Cultivar and Growing Location on the Trypsin Inhibitors, Tannins, and Lectins of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Grown in the Semiarid Highlands of Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 51, n. 20, p. 5962-5966, 2003/09/01 2003.

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

DÍAZ-BATALLA, L. *et al.* Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 54, n. 6, p. 2045-2052, 2006/03/01 2006.

DOMÍNGUEZ, B. M. *et al.* Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *ALAN* [S.I.], v. 52, set 2002.

DONANGELO, C. M. *et al.* Iron and Zinc Absorption from Two Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes in Young Women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 51, n. 17, p. 5137-5143, 2003/08/01 2003.

DORIA, E. *et al.* Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. *Journal of Food Composition and Analysis* [S.I.], v. 26, n. 1-2, p. 72-80, 2012.

ELMAKI, H. B. *et al.* Content of antinutritional factors and HCl-extractability of minerals from white bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars: Influence of soaking and/or cooking. *Food Chemistry* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 362-368, 2007.

GARCÍA-GASCA, T. *et al.* The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology in Vitro* [S.I.], v. 16, n. 3, p. 229-233, 2002.

GARRIDO G, A. *et al.* Fitoestrógenos dietarios y sus potenciales beneficios en la salud del adulto humano. *Revista médica de Chile* [S.I.], v. 131, p. 1321-1328, 2003.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. *J Am College Nutr* [S.I.], v. 13, p. 549-558, 1994.

GHAVIDEL, R. A.; PRAKASH, J. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT - Food Science and Technology* [S.I.], v. 40, n. 7, p. 1292-1299, 2007.

- GREINER, R.; KONIETZNY, U. Functional properties of phytate. *Nutrire* [S.I.], p. 75-89, 2007.
- GUILLON, F. *et al.* Dietary fibre functional products. In: GIBSON, G.; WILLIAMS, C. (Ed.). *Functional foods*. Boca Raton. USA: CRC Press, 2000. p. 315-364.
- GUIMARÃES, V. M. *et al.* Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* [S.I.], v. 58, n. 1, p. 67-73, 2001.
- GUZMÁN-MALDONADO, S. H. *et al.* Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* [S.I.], v. 80, n. 13, p. 1874-1881, 2000.
- HALLIKAINEM, M. A.; UUSITUPA, M. J. Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* [S.I.], v. 69, n. 3, p. 403-410, 1999.
- HERNÁNDEZ-INFANTE, M. *et al.* Impact of microwave heating on hemagglutinins, trypsin inhibitors and protein quality of selected legume seeds. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* [S.I.], v. 52, n. 3, p. 199-208, 1998.
- HU, Y. *et al.* Kaempferol in Red and Pinto Bean Seed (*Phaseolus vulgaris* L.) Coats Inhibits Iron Bioavailability Using an in Vitro Digestion/Human Caco-2 Cell Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 54, n. 24, p. 9254-9261, 2006/11/01 2006.
- HURT, G. B.; AXELROD, B. Characterization of Two Isoenzymes of Lipoxygenase from Bush Beans. *Plant Physiol.* [S.I.], v. 59, n. 4, p. 695-700, 1977.
- IQBAL, A. *et al.* Nutritional yield and amino acid profile of rice protein as influenced by nitrogen fertilizer. *Sarhad Journal of Agriculture* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 127-134, 2009/06/10 2003.
- KNOTT, R. M. *et al.* Alterations in the level of insulin receptor and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle from rats fed a kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) diet. *International Journal of Biochemistry* [S.I.], v. 24, n. 6, p. 897-902, 1992.
- KRITCHEVSKY, D. Vegetable protein and atherosclerosis. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [S.I.], v. 56, n. 3, p. 135-140, 1979.
- KUMAR, C. M. *et al.* Modulatory effect of butyric acid—a product of dietary fiber fermentation in experimentally induced diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [S.I.], v. 13, n. 9, p. 522-527, 2002.

LAIRON, D. Dietary fiber and control of body weight. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 1-5, 2007.

LAJOLO, F. M. *et al.* Qualidade Nutricional. In: ARAÚJO, R. S. *et al* (Ed.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 71-99.

LEE, M.-R. *et al.* Analysis of saponins from black bean by electrospray ionization and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [S.I.], v. 34, n. 8, p. 804-812, 1999.

LEWANDOWSKI, D. J. *et al.* Food product having increased bile acid binding capacity. n. 0887-2333, 2003.

LIAVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* [S.I.], v. 163, n. 3, p. 348-357, 2006.

LIENER IRVIN, E. Plant Lectins: Properties, Nutritional Significance, and Function. In: SHAHIDI, F. (Ed.). *Antinutrients and Phytochemicals in Food*: American Chemical Society, 1997. Cap.3. p. 31-43. (ACS Symposium Series).

LMANOWICZ, B. P. Phaseolin seed variability in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by capillary gel electrophoresis. *J. Appl. Genet* [S.I.], v. 42, p. 269-280, 2001.

LONDERO, P. M. G. *et al.* Análise de frações de fibra alimentar em cultivares de feijão cultivadas em dois ambientes. *Ciência Rural* [S.I.], v. 38, p. 2033-2036, 2008.

LOTTENBERG, A. M. P. *et al.* Eficiência dos Ésteres de Fitoesteróis Alimentares na Redução dos Lípides Plasmáticos em Hipercolesterolemicos Moderados. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [S.I.], v. 79, p. 139-142, 2002.

LUNG'AHU, M. G.; GLAHN, R. P. Use of white beans instead of red beans may improve iron bioavailability from a Tanzanian complementary food mixture. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* [S.I.], v. 80, n. 1, p. 24-31, 2003/08/01 2010.

MA, Y.; BLISS, F. Seed proteins of common bean. *Crop Sci* [S.I.], v. 18, p. 431-437, 1978.

MACHAIAH, J. P.; PEDNEKAR, M. D. Carbohydrate composition of low dose radiation-processed legumes and reduction in flatulence factors. *Food Chemistry* [S.I.], v. 79, n. 3, p. 293-301, 2002.

MANN, J. *et al.* FAO/WHO scientific update on carbohydrates in human nutrition : conclusions. *European journal of nutrition*. [S.l.], v. 61, n. Supplement 1, p. S132-137, 2007.

MARLETT, J. A. *et al.* Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. *Journal of the American Dietetic Association* [S.l.], v. 102, n. 7, p. 993-1000, 2002.

MARTINO, H. S. D. *et al.* Zinc and iron bioavailability of genetically modified soybeans in rats. *Journal of Food Science* [S.l.], v. 72, n. 9, p. 689-695, 2007.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA PROTEÍNA DE FEIJÕES BIOFORTIFICADOS

RESUMO

Atualmente, os programas de melhoramento genético do feijoeiro visam obter variedades que apresentem além da alta produtividade, aliada à resistência as doenças, sementes com maior qualidade tecnológica e nutricional (Mesquita et al., 2007). Embora exista muitos estudos que avaliaram a qualidade proteica de diversos cultivares de feijões comuns é importante considerar que o processo de biofortificação de feijões por melhoramento genético é recente e que são escassos os estudos com estes novos cultivares. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a digestibilidade *in vivo*, o escore químico de aminoácidos (EQ) e o escore químico de aminoácido corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) de dois cultivares de feijões biofortificados em ferro (Fe) e Zn (Zn). A proteína do feijão BRS Pontal (Carioca) apresentou maior valor de digestibilidade que a do feijão BRS Agreste (Mulatinho). No entanto, quando comparado com outras pesquisas que utilizaram feijão comum, os dois cultivares apresentaram digestibilidade inferior aos encontrados na literatura. Com relação aos aminoácidos indispensáveis, os grãos de feijão biofortificados são constituídos em maior parte por leucina, seguido por lisina, fenilalanina, treonina, valina, isoleucina, tironina e histidina. O feijão BRS Pontal apresentou os aminoácidos sulfurados (metionina+cisteína) como limitantes. O escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) do feijão BRS Pontal foi de 44,6%. O cultivar BRS Agreste, ao contrario do que se esperava não obteve nenhum aminoácido limitante, ou seja, os teores de aminoácidos foram superiores ao padrão considerado adequado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), fato que indica a alta qualidade da proteína desse feijão. Conclui-se que as proteínas dos feijões biofortificados com Fe e Zn apresentaram baixa digestibilidade, porém o cultivar mulatinho pode ser

considerado uma boa fonte proteica por apresentar PDCAAS maior ou igual a 1.

1. Introdução

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais consumida no Brasil e em outros países latinos (Pereira e Costa 2002), sendo esta leguminosa uma das principais fontes de proteína dos brasileiros, principalmente entre aqueles com limitado acesso à proteínas de origem animal (Pires et al., 2006; Mesquita e Corrêa, 2007; Brasil-IBGE 2010).

Em relação ao valor nutricional do feijão, pode-se destacar seu elevado teor protéico, ente 15 e 30%, e fonte de lisina (Ribeiro et al, 2007), que exerce efeito complementar às proteínas dos cereais que são deficientes neste aminoácido e são frequentemente consumidos junto às leguminosas. Entretanto, a proteína do feijão é de baixo valor biológico uma vez que apresenta baixo valor nutricional decorrente tanto dos reduzidos teores de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) como da baixa digestibilidade proteica (Genovese e Lajolo, 2001; Pereira e Costa, 2002; Cruz et al., 2003; Luján et al., 2008). Os constituintes presentes nos feijões como os fitatos, taninos e as fibras alimentares, podem contribuir com a baixa digestibilidade proteica (Genovese e Lajolo, 2001; Oliveira et al., 2001; Luján et al., 2008).

Atualmente, os programas de melhoramento genético do feijoeiro visam obter variedades que apresentem além da alta produtividade, aliada à resistência as doenças, sementes com maior qualidade tecnológica e nutricional (Mesquita et al., 2007). Pesquisadores da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) vêm realizando estudos genéticos com a finalidade de melhorar a qualidade, especialmente com respeito à quantidade e qualidade da proteína, teores de ferro (Fe) e zinco (Zn), assim como a redução de fatores antinutricionais (EMBRAPA, 2007).

Embora existam muitos estudos que avaliaram a qualidade proteica de diversos cultivares de feijão comum (Pires et al. 2007; Ramires Cárdenas et al. 2008; Luján et al. 2008) é importante considerar que o processo de melhoramento genético qu e busca melhor valor nutritivo de feijões é recente e que são escassos os estudos com estes novos cultivares. O aumento dos teores de aminoácidos, dispensáveis e

indispensáveis, pode contribuir para que o feijão se torne mais nutritivo, todavia pouco se sabe sobre a composição e biodisponibilidade dos aminoácidos dos cultivares de feijões biofortificados desenvolvidos atualmente no Brasil.

Assim o presente trabalho baseia-se na hipótese que o melhoramento genético aumenta o teor de aminoácidos essenciais dos feijões, conferindo melhoria na qualidade proteica.

2. Material e Métodos

Foram utilizados dois cultivares de feijões contendo Fe e Zn, BRS Agreste (variedade mulatinho) e BRS Pontal (variedade carioca), desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Arroz Feijão (Goiânia, GO). A composição centesimal, o perfil de aminoácidos, o escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAA) e a digestibilidade *in vivo* foram determinados nas farinhas dos feijões.

2.1. Análise da composição química dos feijões

Preparo da farinha de feijão

Para o preparo das farinhas dos feijões, os grãos foram selecionados, lavados e cozidos em água sob pressão na proporção de 1:3 (p/v) até atingir consistência macia, adequada para o consumo. Após o cozimento, os grãos e a água de cocção residual foram pesados, secos em estufa de ventilação à 60 °C por 17 h e moídos em moinho MAO 090 CFT a 2000 rpm. As farinhas foram acondicionadas em sacolas plásticas de polietileno devidamente identificadas e congeladas a -12 °C até o momento do preparo das dietas experimentais.

O teor de nitrogênio, tanto das farinhas como das dietas experimentais prontas, foi determinado pelo método semimicro Kjeldhal, preconizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC 1998), multiplicando-se o resultado pelo fator 6,25 para a obtenção do teor de proteínas.

O perfil de aminoácidos foi determinado a partir do método do feniltiocarbamil aminoácidos (PTC), seguido da derivação pré-coluna com

fenilisotiocianato (PITC) e a separação dos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag-3,9x150 mm) com monitoração em comprimento de onda em 254nm. A quantificação da amostra foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tendo como referência a área do pico padrão de aminoácidos com concentração conhecida, nas mesmas condições e no mesmo tempo que as amostras. Os resultados foram expressos em mg de aminoácido por grama de proteína.

Após a determinação e quantificação do perfil de aminoácidos, determinou-se o escore de aminoácidos, relacionando os mg de aminoácidos, por grama de proteína teste, com os mg de aminoácido, por grama de proteína de referência, sendo utilizada como proteína de referência o requerimento de aminoácidos para crianças de 2 a 5 anos conforme Food and Agriculture Organization (FAO/WHO, 2007). O escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi obtido multiplicando-se o primeiro aminoácido limitante pela digestibilidade verdadeira.

A quantificação dos ácidos hexa e penta-fosfato de inositol, foram realizadas segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990) e o método cromatográfico (Ultra sep®, modelo ES 100 RP18, Leonberg, Alemanha), proposto por Sandberg e Ahderinne (1986).

A determinação do teor de taninos foi realizada de acordo com o método de Price et al. (1978) e expresso em mg de catequina por g de amostra.

2.2. Digestibilidade proteica in vivo

2.2.1. Dietas experimentais e ingredientes

Quatro tipos de dietas foram preparadas, sendo a primeira isenta de proteína (Aproteica), a segunda uma dieta padrão com caseína (Caseína) e duas dietas testes (Pontal) e (Agreste), cujas fontes proteicas foram dos feijões biofortificados com Fe e Zn, conforme apresentado na Tabela 1. A composição das dietas e o teor de proteínas (10%) foram estabelecidos com base nas recomendações da AIN-93G do *American Institute of Nutrition*, segundo (Reeves et al., 1993). As dietas foram ajustadas de

forma a conter em torno de 11% de fibras em função do elevado teor de fibras alimentares presente na farinha dos feijões. Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica, misturados manualmente e peneirados, em seguida, as misturas foram homogeneizadas em batedeira industrial por 15 minutos. Após o preparo, as dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotuladas e armazenadas sob-refrigeração.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas experimentais (g.100 g ⁻¹)			
	Aprotéico	Caseína	Pontal	Agreste
Feijão	-	-	44,13	49,35
Caseína	-	11,18	-	-
Amido dextrinizado	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo	7,00	7,00	6,60	6,50
Fibra (Celulose)	11,40	11,40	1,67	-
Mistura de Minerais	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura de vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00
L – cistina	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	53,35	42,17	19,35	15,90
Densidade Calórica	369,2	369,2	379,6	385,3

Fonte: Adaptado de Reeves et al. (1993). **Aprotéica:** Dieta padrão isenta de fonte proteica; **Caseína:** Dieta padrão com adição de 10% de proteína provida da caseína; **Pontal:** Dieta padrão com adição de feijão Pontal até atingir 10% de proteína; **Agreste:** Dieta padrão com adição de feijão Agreste até atingir 10% de proteína. DC: Kcal/100g

2.2.2. Ensaio biológico

Vinte e quatro ratos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação albinus) recém-desmamados, com 21 dias de vida e peso variando entre 60 e 68g, foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Os animais foram distribuídos em 4 grupos, com 6 animais cada, de modo que a diferença da média dos pesos entre os grupos não excedesse 8g. O grupo que recebeu dieta isenta de proteína foi denominado grupo aprotéico, os grupos que receberam dieta tendo como fonte de proteína a caseína, o feijão BRS pontal e o feijão BRS agreste, foram identificados como grupo Caseína, Pontal e Agreste, respectivamente.

Durante os 14 dias de experimento, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada a 22 °C e ciclo de claro e escuro de 12 horas controlado automaticamente. A dieta e água filtrada foram oferecidas *ad libitum*. O consumo alimentar e o peso dos animais foram monitorados semanalmente. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi determinado de acordo com a razão entre o ganho de peso total (g) e consumo total de dieta (g).

Todos os procedimentos adotados no ensaio biológico foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, sendo o protocolo do estudo avaliado, aprovado pelo Comitê de Ética, protocolo nº 64/2010, da Universidade federal de Viçosa.

Para a determinação da digestibilidade, nos dias 8º e 12º os animais receberam dietas marcadas com índigo carmin na proporção de 200 mg/100 g de dieta. As fezes foram coletadas do 9º ao 13º dias e acondicionadas em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob-refrigeração. Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar a 105 °C por 24 h. Em seguida foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador para determinação da concentração de nitrogênio, pelo método semimicro Kjeldahl, com amostras em triplicata, segundo AOAC (1995).

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a excretada nas fezes e a perda fisiológica nas fezes, que corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica. O cálculo da digestibilidade verdadeira (DV) foi feito de acordo com a seguinte equação:

$$\text{(\% Digestibilidade Verdadeira)} = \frac{I - (F - FK)}{I} \times 100 \quad \text{Onde:}$$

I = Nitrogênio ingerido pelo grupo teste

F = Nitrogênio fecal do grupo teste

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica

O Coeficiente de Eficácia Proteica (PER) foi determinado por meio do método de Osborne, Mendel e Ferry, de acordo com a AOAC (1975).

Este método relaciona o ganho de peso dos animais com o consumo de proteína. Para o cálculo do PER, utilizou-se a seguinte razão:

PER = Ganho de peso (g) do grupo teste / Proteína consumida (g) pelo grupo teste

A Razão Proteica Líquida (NPR) foi determinada, de acordo com Bender e DoelL (1957), no 13º dia do experimento, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo teste, mais a perda de peso do grupo com dieta aprotéica em relação ao consumo de proteína do grupo teste, usando a equação:

NPR = Ganho de peso (g) do grupo teste + Perda de peso (g) do grupo aprotéico / Proteína consumida (g) do grupo teste

O valor de NPR das dietas do grupo-teste expresso como percentual em relação à caseína é denominado NPR relativo (NPRR) e o valor de PER das dietas do grupo-teste expresso como percentual em relação à caseína é denominado PER relativo (PERR). O valor de DV das dietas do grupo-teste expresso como percentual em relação à caseína é denominado DV relativa (DVR).

Para o cálculo do escore químico e escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS), foram utilizados os valores da digestibilidade verdadeira determinada *in vivo* no ensaio biológico, os teores de nitrogênio, proteína, aminoácidos indispensáveis e o escore padrão de aminoácidos da Food and Agriculture Organization (FAO/WHO 2007). O escore químico é o valor obtido a partir da razão entre teor de aminoácido na proteína (mg/g) e o padrão da FAO, sendo considerado como limitante aquele aminoácido com o escore químico menor que 1. O PDCAAS se baseou no valor do escore químico do aminoácido essencial mais limitante de cada um dos feijões sendo o cálculo realizado de forma a multiplicar o escore mais baixo destes aminoácidos pela digestibilidade da proteína.

2.4. Análise estatística

O tratamento dos dados foi realizado a partir da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% probabilidade. A escolha por testes paramétricos foi feita de acordo com o resultado obtido no teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de igualdade de variâncias de Bartlett, empregando o nível de significância de 0,1% de probabilidade ($P < 0,001$). As análises foram realizadas utilizando o *software* Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

3. Resultados e Discussão

A concentração de proteína encontrada nos feijões Pontal e Agreste variou de 21 a 23% (Tabela 2). Além de uma boa fonte de proteínas os feijões apresentaram uma excelente fonte de fibras alimentares (20%) que podem trazer benefícios diversos a saúde. Os feijões contendo Fe e Zn apresentaram um aumento de 50 e 20% desses minerais respectivamente, quando comparado às variedades comuns (Ramírez-Cárdenas et al., 2008; Leonel et al., 2008).

Tabela 2 - Composição química das farinhas dos feijões BRS Pontal e BRS Agreste, com base na matéria seca

COMPONENTES	BRS Pontal	BRS Agreste
Umidade (g.100 g ⁻¹)	8,20	8,40
Carboidratos totais (g.100 g ⁻¹)	39,80	40,60
Proteína bruta (g.100 g ⁻¹)	23,40	21,01
Lipídio (g.100 g ⁻¹)	0,97	1,10
Fibra alimentar total (g.100 g ⁻¹)	24,02	25,23
Insolúvel (g.100 g ⁻¹)	21,16	21,56
Solúvel (g.100 g ⁻¹)	2,86	3,67
Cinzas (g.100 g ⁻¹)	3,60	3,70
Ferro (mg. 100 g ⁻¹)	8,46	9,64
Zinco (mg. 100 g ⁻¹)	4,17	2,96
Tanino (mg ET. 100 g ⁻¹)	37,24	26,78
Fitato (µg. 100 g ⁻¹)	102,02	78,4

Quanto à composição de aminoácidos indispensáveis os valores dos aminoácidos do padrão FAO/OMS foram comparados com os do feijão

Pontal e Agreste, conforme mostrado na Tabela 3. O padrão reflete as necessidades de aminoácidos essenciais que o ser humano necessita. O cultivar BRS Pontal apresentou níveis deficientes de cisteína e metionina (0,76), em relação aos padrões FAO de referência, à similaridade dos dados descritos na literatura (Ramires Cárdenas et al 2008). O feijão BRS Agreste não apresentou aminoácidos limitantes e teve maior concentração de aminoácidos sulfurados Cisteína e Metionina que o Pontal (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição química quanto ao teor de aminoácidos indispensáveis, Escore químico e PDCAAS dos feijões BRS Pontal e BRS Agreste

Aminoácidos Indispensáveis	Composição (mg de aa/g de PTN)		*Padrão FAO / WHO (2007)	Escore Químico	
	Pontal	Agreste		Pontal	Agreste
Phe + Tyr	85,47	88,95	46	1.86	1.93
His	31,63	29,48	18	1.75	1.64
Ile	44,21	45,30	31	1.43	1.46
Leu	80,84	80,54	63	1.28	1.28
Lys	64,98	68,72	52	1.25	1.32
Met + Cys	19,66	26,65	26	0.76	1.02
Thr	51,06	48,56	27	1.89	1.79
Val	43,79	48,33	42	1.04	1.15
DV				59%	42%
PDCAAS				44,8%	

aa: aminoácido; PTN: Proteína; PDCAAS: Escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (1º aminoácido limitante x digestibilidade verdadeira da proteína (DV), obtida em experimento com ratos) *Padrão FAO/WHO para crianças de 1 a 2 anos de idade (2007)

Os feijões Pontal e Agreste são constituídos em maior parte por pelos aminoácidos indispensáveis: leucina, seguido por lisina, fenilalanina, treonina, valina, isoleucina, tironina, histidina, metionina e cisteína (Tabela 3). De acordo com Franco (2005) alimentos com elevado teor de lisina são desejáveis, em razão de esse aminoácido, juntamente com a arginina e a serina, promover maior absorção do teor de cálcio pelo organismo, porque influencia o pH intestinal e a formação de compostos solúveis cálcio-aminoácidos. Por sua vez, a leucina, a isoleucina e a valina contribuem com a recuperação de traumas múltiplos e de queimaduras, além de ter participação no restabelecimento de processos metabólicos normais, quando o fígado se encontra debilitado (Costa, 2003).

Pela avaliação do computo químico, a proteína do feijão BRS Agreste não apresentou aminoácidos limitantes dentre aqueles avaliados pelo escore químico (Tabela 3), apresentando, portanto uma proteína de melhor qualidade em relação ao feijão BRS Pontal, que teve um escore químico menor que 1,0 para os aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína).

Outros parâmetros utilizados para a determinação da qualidade protéica são o coeficiente de eficácia protéica (PER) e o (NPR) Razão protéica líquida que relaciona o ganho de peso dos animais com o consumo de proteína e esses são comparados a uma proteína padrão, no caso a caseína. Os valores de PER e NPR encontrados para os feijões Pontal e Agreste foram 46 e 44% e 81 e 75% menores que aqueles do grupo que recebeu caseína. A partir desses resultados podemos verificar que os feijões não apresentaram diferença estatística entre eles e foram inferiores a caseína em qualidade nutricional. Eles não foram capazes de promover um crescimento adequado dos ratos, através da qual a média de ganho de peso do grupo caseína foi de 57g e do grupo Pontal e Agreste foram de 21g em média, conforme mostrado na Tabela 4.

Esse dado é bastante interessante, pois, embora o feijão Agreste tenha apresentado composição de aminoácidos essenciais adequadas para promover crescimento de humanos em fase de desenvolvimento, é importante ressaltar que não houve aproveitamento biológico dos aminoácidos (biodisponibilidade), como mostrou os índices PER e NPR.

Os animais que consumiram a dieta a base de feijão apresentaram índices de qualidade protéica, PER e NPR menores que aqueles que receberam a dieta padrão em caseína. No grupo Pontal o percentual de adequação médio relativo à caseína para NPR foi semelhante ($P>0,05$) (Tabela 4) ao grupo Agreste, que apresentou pior resultado ($P<0,05$) para digestibilidade verdadeira (Tabela 5).

Tabela 4 - Média dos parâmetros biológicos de qualidade proteica dos grupos experimentais

Grupos	GP (g)	CA (g)	PI (g)	PEF (g)	PER	NPR
Caseína	57,3±6,7 ^a	180,1±5,9 ^a	1,39 ^a	6,8±0,98 ^c	3,46±0,35 ^a	2,59±0,36 ^a
Pontal	21,0±7,5 ^b	113,3±30,9 ^b	0,87 ^b	32,9±1,1 ^b	1,86±0,37 ^b	0,49±0,61 ^b
Agreste	21,5±2,3 ^b	113,9±18,7 ^b	0,88 ^b	38,4±2,8 ^a	1,93±0,39 ^b	0,64±0,24 ^b

Caseína: animais (n=6) alimentados com dieta padrão com adição de caseína como fonte proteica. **Pontal:** animais alimentados com dieta padrão com adição de feijão Pontal como fonte proteica; **Agreste:** animais alimentados com dieta padrão com a dição de feijão Agreste como fonte proteica. **GP:** Ganho de peso. **CA:** Consumo alimentar. **PI:** Proteína total ingerida na dieta. **PEF:** Proteína total excretada. **PER:** Coeficiente de eficácia proteica. **NPR:** Razão proteica líquida. Médias na coluna seguidas de uma mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A quantidade de proteína excretada nas fezes esta diretamente relacionada à quantidade de proteína consumida e a eficiência da digestibilidade dessa proteína pelo tratogastrointestinal. No caso dos feijões, embora o consumo de proteínas tenha sido menor que o grupo caseína, a excreção de proteínas foi muito maior, indicando que houve um menor aproveitamento das proteínas que foram consumidas (Tabela 4).

A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microorganismos do intestino grosso (NAVES et al, 2004; PIRES et al (1), 2006).

A digestibilidade da proteína dos feijões foi avaliada pela diferença do nitrogênio ingerido e o excretado nas fezes, proveniente da dieta, das células de descamação do tubo digestivo, do suco gástrico e da microflora intestinal. Para um melhor cálculo da digestibilidade, a excreção do nitrogênio fecal do grupo teste foi corrigida pelo nitrogênio fecal do grupo aprotéico (MUJICA et al, 2001).

Ao comparar os resultados de digestibilidade obtidos para os feijões com aqueles observados para o grupo caseína, verificou-se que o feijão Pontal (64%) apresentou um valor de digestibilidade verdadeira significativamente maior que o Feijão Agreste (45%) e os dois feijões apresentaram digestibilidade inferior ao padrão Caseína (Tabela 5).

Tabela 5 – Média dos fatores antinutricionais e dos parâmetros de digestibilidade in vivo e escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS).

Grupos	Cons Tan (mg)	Cons Fit (µg)	DV (%)	DR (%)	PDCAAS (%)
Caseína	0,0	0,0	92,0±0,02 ^a	100	-
Pontal	18,49	50,99	59,0±0,13 ^b	64,0	44,6
Agreste	15,05	44,06	42,0±0,13 ^c	45,9	-

Caseína: animais (n=6) alimentados com dieta padrão AIN-93G com adição de caseína como fonte proteica.

Pontal: animais alimentados com dieta padrão com adição de feijão Pontal como fonte proteica;

Agreste: alimentados com dieta padrão com a dição de feijão Agreste como fonte proteica

ConsTan: Consumo de tanino durante todo o período experimental. **CFit:** Consumo de fitato durante todo o período experimental animais. **DV:** Digestibilidade verdadeira. **DR:** Digestibilidade relativa. Médias na coluna seguidas de uma mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A Digestibilidade dos feijões BRS Pontal e Agreste foi inferior aos resultados encontrados por diversos autores que trabalharam com feijões comuns (Pires et al., 2005; Cruz et al., 2003; Oliveira et al., 2003; Lújan et al., 2008; Leonel et al., 2008 e Ramírez-Cárdenas et al., 2008), (de 78,7 a 91,2%). Outros estudos citados por Rios et al (2003) e Abreu et al. 2003, que avaliaram a digestibilidade de feijões em animais e em humanos, os valores variaram de 10 a 70%.

A baixa digestibilidade dos feijões pode ser considerada multifatorial e uma explicação para a grande variação nos resultados dos estudos pode estar relacionado ao método de preparo das amostras, local de produção, variedade do feijão, tempo, condições de armazenamento e processamento, bem como a presença de fatores antinutricionais. A presença de fatores antinutricionais como tanino e fitatos pode ser uma possível explicação para a baixa digestibilidade encontrada para estes grãos. De acordo com vários autores os taninos são potentes inibidores de enzimas por complexarem com proteínas enzimáticas, o que pode explicar a baixa digestibilidade das proteínas das leguminosas, inibição do crescimento e aumento da excreção de nitrogênio fecal em animais (Bressani 1993; Genovese e Lajolo, 2001; Oliveira et al., 2001; Luján et al., 2008). O fitato sob condições fisiológicas são capazes de interagir extensivamente com proteínas e minerais, formando complexos insolúveis reduzindo a biodisponibilidade de nutrientes. Complexos fitato-

proteína/aminoácido são de difícil digestão, reduzindo a utilização de proteínas. Sebastian et al, 1998; Selle et al., 1997). relataram uma ação redutora do fitato sobre a atividade das enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina) e amilolíticas (α -amilase), afetando a digestibilidade e disponibilidade da proteína, amido e, conseqüentemente, da energia. Segundo Cowieson et al. (2006), a presença de ácido fítico na dieta promove alteração no turnover das células do intestino provocando maior produção de mucina e conseqüente aumento na perda de nitrogênio endógeno e nos requerimentos de energia.

Os teores de fitato e taninos presentes nos feijões BRS Pontal e Agreste estão dentro da faixa esperada para leguminosas e são semelhantes aos encontrados em outros estudos com feijões comuns (Ramirez-Cárdenas et al. (2008), Pires et al. (2006). Os ratos consumiram 18 e 15 mg de tanino e 50 e 44mcg de fitato durante todo experimento (Tabela 4). A exposição prolongada a pequenas quantidades de substâncias consideradas antinutrientes, como fitatos e taninos foi suficiente para prejudicar a digestão e absorção de proteínas essenciais e comprometer crescimento dos animais.

O resultado do escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) do feijão BRS Pontal foi de 44,6% (Tabela 5). Para o feijão BRS Agreste, o qual não apresentou aminoácido limitante (Tabela 2), não foi determinado o valor de PDCAAS. Segundo o parâmetro do PDCAA, a qualidade da proteína avaliada pelo escore químico é baseada no aminoácido essencial limitante, no qual valores maiores que 1,0 tanto para o escore químico como para o PDCAAS indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais, capazes de suprir as necessidades para a dieta de humanos.

Portanto, pela avaliação do PDCAAS, como o feijão BRS Agreste não apresentou aminoácido limitante é pressuposto que este feijão tenha uma qualidade proteica superior a de outras variedades que naturalmente contenham aminoácidos limitantes. No entanto, o BRS Agreste apresentou digestibilidade proteica muito inferior a do BRS Pontal e de outras variedades comuns, indicando que na presença de fatores antinutricionais,

comuns em feijões a disponibilidade dos aminoácidos pode ser comprometida.

Embora o método PDCAAS tenha sido amplamente aceito, algumas questões têm sido levantadas na comunidade científica como: 1) a validade da exigência dos valores de aminoácidos para crianças pré-escolares sendo que o padrão de pontuação não inclui os aminoácidos condicionalmente indispensáveis, e estes aminoácidos também contribuem para o valor nutritivo de uma proteína, validade da correção fecal em vez de digestibilidade ileal, há fortes evidências de que digestibilidade ileal, e não fecal, seja o parâmetro correto para a correção do escore de aminoácidos. O uso de digestibilidade fecal superestima o valor nutritivo de uma proteína em função das possíveis interferências da flora bacteriana no metabolismo de aminoácidos no intestino grosso (Fan e Sauer, 1995). A maioria das proteínas e aminoácidos que entram no intestino grosso são excretadas ou incorporadas as proteínas microbianas, a qual representa a maior fração do nitrogênio fecal (Laplace et al., 1994). Desse modo, a digestibilidade ileal é teoricamente a melhor estimativa da disponibilidade dos aminoácidos em relação à digestibilidade fecal.

A truncagem dos valores PDCAAS a 100 % pode ser defendida apenas para o número limitado de situações em que a proteína é utilizada como a única fonte de proteína na dieta. Para a avaliação do valor nutricional das proteínas como parte de dietas mistas, o valor truncado não deve ser usados. Nesses casos, é necessária uma avaliação mais pormenorizada da contribuição da proteína para a composição de aminoácidos de uma dieta mista.

Desde então, vários estudos nessa área foram publicados (por exemplo, Caine et al. 1997a e 1997b , Huisman et al. 1993 , Rowan et al. 1994 , Van Leeuwen et al. 1996) indicando que os fatores antinutricionais associados com proteínas dietéticas podem aumentar substancialmente as perdas endógenas de aminoácidos e, por conseguinte, reduzir o valor nutricional das proteínas. Só a digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos levará essas perdas em conta (Darragh et al. 1998) , e , por conseguinte, é oportuno considerar a utilização de íleo em vez de valores de digestibilidade fecais .

4. Conclusão

Os feijões BRS Agreste e BRS Pontal apresentaram elevado teor de proteínas, fibras alimentares e Minerais.

O feijão Agreste apresentou adequado perfil de aminoácidos essenciais e o Pontal foi limitante em aminoácidos sulfurados.

Os feijões apresentaram digestibilidade verdadeira baixa, possivelmente devido a presença de fatores antinutricionais.

O feijão Agreste apresentou menores teores de taninos e fitatos que o feijão Pontal.

Embora o feijão BRS Agreste tenha apresentado escore químico de aminoácidos superior ao feijão BRS Pontal, os parâmetros biológicos de avaliação da qualidade proteica indicaram que esses aminoácidos não estão biodisponíveis e, portanto não podem ser considerados como uma boa fonte proteica.

5. Referencias Bibliográficas

- Antunes, P. L., A. B. Bilhalva, et al. (1995). "Valor nutricional do feijão (Phaseolus vulgaris L.) cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2." Revista Brasileira de Agrociência 1(1): 12-18.
- AOAC (1975). "Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists. 12. ed. Washington DC, 110 p."
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. 1298 p.
- AOAC (1995). "Association of the Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16. ed. Washington, DC, p.1141."
- AOAC (1998). "Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists. 16. ed. Washington DC".
- Bender, A. E. and B. H. Doell (1957). "Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis." British Journal Nutrition 11: p. 138-143.
- Brasil-IBGE. (2002-2003). "- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002- 2003. (POF 2002-2003). URL: <http://www.ibge.gov.br>." Acessado em 26 de junho de 2010.
- Brasil-IBGE (2010). - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008- 2009. (POF 2008-2009). URL: <http://www.ibge.gov.br>; publicado em 16 de dezembro de 2010.
- Bressani, R. (1993). "Grain quality of common beans." Food Reviews International 9: 237-297.
- Cruz, G., M. G. Oliveira, et al. (2005). "Comparação entre a digestibilidade proteica in vitro e in vivo de diferentes cultivares de feijão (phaseolus vulgaris l.) armazenados por 30 dias." Alimentos e Nutrição Araraquara 16(3): 265-271.
- Cruz, G., M. G. A. Oliveira, et al. (2004). "Avaliação da digestibilidade proteica, inibidor de protease e fibras alimentares de cultivares de feijão (Phaseolus vulgaris L.)." Brazilian Journal of Food Technology, Campinas 7(2): 103-109.
- Cruz, G. A. D. R., M. G. A. Oliveira, et al. (2003). "Protein quality and in vivo digestibility of different varieties of bean (Phaseolus vulgaris L.)." Brazilian Journal of Food Technology 6(2): 157-162.
- Delfini, R. A. and S. G. Canniatti-Brazaca (2009). "Polifenóis e sua interação com a digestibilidade e tempo de cocção em feijão comum." Alimentos e Nutrição Araraquara 19(4): 401.

- Di Primio, E. M., G. B. Kabke, et al. (2008). "Efeito do teor protéico no crescimento de ratos wistar." XVIII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, Brasil.
- EMBRAPA (2005-2007). "Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). EMBRAPA Arroz e Feijão de Brasília. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_2_28102004161635.html.>"
- FAO/WHO (1985). "Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Informe de una reunión consultiva conjunta fao/who/unu de expertos. Energy and protein requirements. Geneva, 724 p."
- Ferreira, C. M., M. J. Del Peloso, et al. (2002). "Feijão na economia nacional. Santo Antônio de Goiás: Embrapa-CNPAP. 47p.(Documentos, 135)."
- Genovese, M. I. e Lajolo. F. M (2001). "Atividade inibidora de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Avaliação crítica dos métodos de determinação." Archivos Latinoamericanos de Nutrición 51(4): 386-394.
- Henley, E. C. and J. M. Kuster (1994). "Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring." Food Technology 4: 74-77.
- IAL (1985). "Instituto Adolfo Lutz (IAL). Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3.ed. São Paulo, v.1, 533p, 1985".
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 e 2008-2009. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 19 mai. 2011a.
- Leterme, P. and M. L. Carmenza (2002). "Factors influencing pulse consumption in Latin America." Br. J. Nutr 88(3): S251-S255.
- Luján, D. L. B., A. J. Leonel, et al. (2008). "Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade proteica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos." Ciênc. Tecnol. Aliment 28(Supl.): 142-149.
- Mesquita, F. R., A. D. Corrêa, et al. (2007). "Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica." Ciênc. agrotec 31(4): 1114-1121.
- Oliveira, A. C., K. S. Queiroz, et al. (2001). "O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose." Arch. Latinoam. Nutr 51(3): 276-283.
- Oliveira, V. R., N. D. Ribeiro, et al. (2008). "Qualidade nutricional e microbiológica de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido com ou sem água de maceração." Ciênc. agrotec 32(6): 1912-1918.
- Pereira, C. A. S. and N. M. B. Costa (2002). "Proteínas do feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (germ-free)." Rev. Nutr 15(1): 5-14.

- Pires, C. V., M. G. A. Oliveira, et al. (2006). "Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas." *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 26(1): 179-187.
- Pires, C. V., M. G. d. A. Oliveira, et al. (2005). "Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)." *Alim. Nutr Araraquara* 16(2): 157-162.
- Prosky, L. e. a. (1988). "Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products. Interlaboratory study." *Journal. Assoc. Off. Anal. Chem* 71(5): 1017-1023.
- Ramirez-Cárdenas, L., A. J. Leonel, et al. (2008). "Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum." *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* 28(1): 200-213.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "AIN-93 - Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." *Journal of Nutrition* 123(11): 1939-51.
- Grizard, J.; Dardevet, D. Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition*. v. 23, p. 323-331, 2007.
- Ribeiro, N. D., P. M. G. Londero, et al. (2007). "Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético." *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília* 42(10): 1393-1399.
- Rios, A. O., C. M. P. Abreu, et al. (2003). "Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)." *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23(Supl): 39-45.
- WANDER, A.E Consumo per capita de feijão no brasil de 1998 a 2010: uma comparação entre consumo aparente e consumo domiciliar. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br>
- WANDER, A.E. Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975-2005. *Informações Econômicas, São Paulo*, v.37, n.2, 2007, p.7-21.

CAPÍTULO 2

FEIJÕES BIOFORTIFICADOS: BIODISPONIBILIDADE DE FERRO COMPARÁVEL AO SULFATO FERROSO

RESUMO

A biofortificação de feijão com ferro (Fe), por meio do melhoramento genético clássico, tem se tornado uma alternativa viável para melhorar a qualidade nutricional de alimentos básicos e assim possibilitar a redução de carência de Fe, considerada endêmica em determinadas regiões do País. Objetivou-se determinar a biodisponibilidade in vivo de Fe dos cultivares BRS Agreste e BRS Pontal biofortificados com Fe e Zn. Para o ensaio de biodisponibilidade de Fe, pelo método da depleção/repleção, foram utilizados 32 ratos machos, wistar, com 21 dias de idade. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizados com 32 unidades experimentais, sendo quatro grupos com oito repetições. Os grupos receberam dieta com adição de Fe na forma de sulfato Feso (controle positivo), dieta sem adição de qualquer fonte de Fe (controle negativo), e dietas testes, adicionadas de farinhas de feijões biofortificados como fonte de Fe. As dietas foram padronizadas para conter 12mg de Fe/ Kg de dieta. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O consumo de Fe e ganho de hemoglobina foram menores nos grupos que receberam feijões como fonte de Fe (G3 e G4), quando comparados ao grupo controle que recebeu sulfato Feso (G2). No entanto, os valores encontrados para coeficiente de eficiência alimentar (21, 20 e 19%) e HRE (78, 70 e 68%) não diferiram entre os grupos que receberam feijões biofortificados (G3 e G4) e o controle (G2). Os resultados encontrados mostraram que a biodisponibilidade de Fe dos feijões biofortificados foi comparável a biodisponibilidade de Fe do sulfato Feso e que os fatores antinutricionais presentes nestes feijões não foram suficientes para prejudicar a biodisponibilidade de Fe dos mesmos.

1. Introdução

Anemia por deficiência de Fe é um problema de saúde pública que atinge aproximadamente um quarto da população mundial, sendo a maior prevalência em mulheres e crianças. Segundo Organização Mundial de Saúde a deficiência desse micronutriente não é exclusiva de países em desenvolvimento e pode existir até mesmo em populações onde o suprimento de alimento é adequado (WHO, 2008). Os esforços globais para reduzir a incidência de anemia têm sido amplamente direcionados para o consumo crescente de suplementação de Fe por meio da fortificação e biofortificação de alimentos, além da diversificação da dieta.

No Brasil, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) coordena as pesquisas sobre biofortificação de alimentos básicos, como arroz, feijão, batata-doce, mandioca, milho, feijão-caupi, trigo e abóbora (Nutti, 2008). Em outros países, como nas Filipinas, existem estudos em biofortificação de sementes de arroz enriquecidas com Fe. Na Alemanha introduziu-se o β -caroteno no endosperma do arroz para produção do “Arroz Dourado” e, em Uganda, a batata doce está sendo biofortificada com caroteno de forma eficiente (Zancul, 2004).

No Brasil, a biofortificação genética do feijão com Fe e Zn têm concentrados esforços inicialmente no screening do germoplasma existente e nos acessos do banco ativo de germoplasma. O feijão além de ser uma fonte considerável de proteínas, vitaminas e minerais pode representar uma boa alternativa para aumentar a ingestão de Fe por populações que consomem esse grão como alimento básico (Costa et al. 2011).

Estudos sobre a biodisponibilidade de Fe em feijões biofortificados são escassos, havendo, portanto, a necessidade de realizar estudos que comprovem a eficácia da biofortificação. Ross et al. (2000) verificaram que variedade de feijão com altos teores de Fe resultaram em maiores biodisponibilidade de Fe em ratos que outras variedades com baixos teores desse elemento. Segundo os autores essa variação não foi dependente somente do conteúdo de Fe, mas também do genótipo estudado. Além disso, a absorção de Fe é influenciada por fatores estimuladores (ácido ascórbico) e inibidores (fitatos e taninos) que são encontrados em

leguminosas (Costa, 2003). Assim, o aumento do teor de Fe em feijões por meio do processo de biofortificação pode não ser necessariamente uma garantia de uma maior biodisponibilidade de Fe. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a biodisponibilidade de Fe em ratos alimentados com feijões biofortificados com Fe e Zn.

2. Material e Métodos

2.1. Cultivares de feijão

O projeto de biofortificação de feijoeiro comum busca de novas fontes de Fe e Zn, observando as interações genéticas ocorridas entre os acessos e o ambiente. Inicialmente foram selecionados genótipos superiores para Fe e Zn que foram utilizados como genitores em cruzamentos biparentais visando à formação de populações segregantes promissoras.

O método consiste em avaliar por vários anos e em diferentes épocas de cultivo, genótipos de diversas origens sob condições normais de irrigação e estresse hídrico. As análises foram realizadas no Laboratório de Química de Solo e Planta, Embrapa arroz e feijão. Onde cada um dos genótipos foram avaliados seguindo a metodologia otimizada a partir do método oficial da AOAC nº 9. 1.06 (AOAC, 1995).

Essas populações serão avançadas para obtenção de linhagens biofortificadas com maior estabilidade desses minerais nos diferentes ambientes de cultivo e resistentes à seca com teor de Fe (próximo de 100 ppm) e de Zn (próximo de 50 ppm).

As cultivares de feijões biofortificados com Fe e Zn (BRS Agreste e BRS Pontal) utilizadas, foram desenvolvidas e fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Arroz e Feijão de Goiás) em maio de 2010. O desenvolvimento de germoplasma para as linhagens contendo altos teores de Fe e Zn foi realizado seguindo um protocolo de identificação, seleção e cruzamento entre os genótipos oriundos de varias localizações geográfica do país, avaliação e seleção de linhagens em ensaios com repetições por 4 anos e finalmente identificação de novas cultivares, com registro, proteção e produção de sementes básicas.

As sementes utilizadas ainda não atingiram o alvo da biofortificação de Fe e Zn (100ppm e 50ppm) e suas características agrônômicas são apresentadas a seguir:

A BRS Pontal (LM 95102774) é uma cultivar de alto potencial produtivo (4.271kg/ha) e arquitetura de planta prostrado. Apresenta resistência ao Mosaico Comum e Antracnose; resistência intermediária ao

Crestamento Bacteriano, Fusarium e à ferrugem. A BRS Pontal é uma cultivar com tipo de grão comercial carioca, ciclo normal (85 a 95 dias) e originou-se do cruzamento BZ3836//FB166/AN910523. O teor de Fe atual é 84,6 ppm.

A cultivar BRS Agreste é uma cultivar com alto potencial produtivo (3.356 Kg/ha) e boas qualidades culinárias. Apresenta porte de planta ereto e com resistência ao acamamento. Apresenta resistência ao mosaico comum, reação intermediária à antracnose e *Fusarium*. Apresenta uniformidade de coloração e de tamanho de grãos, massa média de 100 grãos de 25 g e tempo de cozimento em torno de 32 minutos. A cultivar BRS Agreste originou-se do cruzamento biparental entre os genitores CB 912052 e AN9022180. O teor de Fe atual é de 96,4 ppm.

2.2. Preparo da farinha de feijão

Os feijões foram selecionados, lavados e cozidos sob pressão na proporção de 1:2 (p:v) até atingir consistência macia, própria para o consumo e mínimo de água de cocção residual. Posteriormente os feijões foram secos em estufa de ventilação por 17 horas à 60 °C e moídos em moinho de faca MAO 090 CFT, com peneira de espessura de 0,84mm (20 mesh) e rotação 420 x g. As farinhas obtidas foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos, rotulados e congelados a -12 °C até o momento do preparo das dietas experimentais.

2.3. Composição Química

A umidade foi determinada de acordo com os procedimentos descritos pelo Instituto Adolf Lutz (1985).

O teor de cinzas e minerais foram determinados seguindo as normas metodológicas da Association Official Analytical Chemists (AOAC, 1984). Em um grama de farinha de feijão foi adicionado 10 mL de solução nitroperclórica (3:1 v/v) e em seguida as amostras foram colocadas em bloco digestor com aquecimento e exaustão, sendo mantidas nesta condição até a formação de uma solução límpida. Após a digestão, o material foi transferido para um balão volumétrico (25 mL) e o volume foi

completado com água deionizada. Essa mistura contida no balão foi utilizada para determinação dos teores de minerais e cinzas. Para cada amostra de farinha de feijão foi realizada três digestões.

A concentração de Fe e Zn foi determinada por espectrometria de absorção atômica. Os teores de potássio (K) foram determinados por fotometria de chama, com limite de detecção da ordem de partes por milhão (ppm). Os outros elementos de interesse como cálcio, cobre, magnésio, manganês foram determinados por ICP-Emission Spectroscopy e o fósforo por colorimetria.

O teor de proteína bruta foi determinado usando o método de semimicro-Kjeldahl (AOAC, 1996). O teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25 para cálculo da percentagem de proteínas bruta.

A extração dos lipídios foi realizada segundo o método intermitente Soxhlet (Gomes et al. 1996).

O teor de fibra alimentar total (FAT) e fibra alimentar insolúvel (FAI) foram determinados de acordo com o método enzimático gravimétrico. As fibras solúveis foram medidas pela diferença entre a FAT e FAI (AOAC, 2002).

A determinação dos carboidratos foi realizada por diferença, sendo subtraídos de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas (AOAC, 1984).

A determinação da concentração de taninos foi realizada pelo método de reação vanilina segundo Burns e colaboradores (1962). Amostras de 0,2 g das farinhas de feijão foram suspensas em 10 ml de solução a 1% de HCl em metanol, de acordo com Maxson e Rooney (1972). Os tubos foram colocados em agitador automático a 80 rpm durante 20 minutos para a extração dos taninos (Prince et al., 1978). Em seguida foram centrifugado a 3.000 rpm, por 20 minutos, e do sobrenadante, alíquotas de 1 mL foram retirados e colocadas em tubo de ensaio. A cada alíquota foram adicionadas 2,5 mL de solução a 1% de vanilina em metanol e 2,5 mL de solução a 8% de HCl em metanol. Os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos e as absorvâncias foram medidas a 500 nm contra o branco reagente. Foram subtraídas das leituras das amostras a absorvâncias dos brancos, onde a solução de vanilina foi

omitida. Foi construída uma curva analítica de catequina onde 200 mg do composto foram diluídos em 200 mL de metanol, sendo o volume ajustado em balão volumétrico. Alíquotas de 5,10,20, 25 e 50 foram retiradas da solução concentrada e o volume foi ajustado para 100 mL em balão volumétrico com metanol. Em seguida, procedeu-se da mesma maneira indicada para a determinação do tanino nas amostras que foram substituídas por essas soluções. Por meio da equação de regressão linear ($R^2=0,9885$) para expressar o teor de taninos em miligrama EC/grama de amostra.

A extração e quantificação dos diferentes mio-inositol fosfatos foi realizada segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990) e o método cromatográfico (Ultra sep®, modelo ES 100 RP18, Leonberg, Alemanha), proposto por Sandberg e Ahderinne (1986). Foi pesado 1g de farinha de feijão liofilizada em freeze-drier desidratado em triplicata e a extração dos mio-inositol foi feita com 20 mL de ácido clorídrico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) por 2 horas, à $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse material foi centrifugado a $1.000 \times g$ por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubo de vidro e mantido em repouso por 12 horas. Em seguida o sobrenadante foi filtrado utilizando uma membrana Milipore de 0,2 micrometros (ME 24 Sigma) e 1 mL do filtrado foi diluído em 24 mL de água. Esse volume de 25 mL foi então passado em coluna cromatográfica de troca iônica AG1- X8 100-200 mesh. A coluna foi preparada em suporte de vidro (20 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro) com 5g de resina AG1- X8 e 5mL de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}). Essa mistura foi deixada em repouso por 12 horas. Em seguida, a coluna foi carregada com 3 mL de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) e, as amostras foram passadas em volumes de 1 mL, eluídas com 8 mL de ácido clorídrico (2 mol L^{-1}). A coluna foi lavada com 3mL de hidróxido de sódio utilizando-se fenolftaleína como indicador da saída total do ácido clorídrico finalizando assim a coleta dos mioinositóis. A coluna foi lavado novamente com 5 mL de água e carregada com 5mL de hidróxido de sódio para o reuso entre as repetições. O volume eluído foi concentrado em evaporador rotatório até secagem completa e suspenso em 1 mL de água. Desta suspensão 20 μL foram utilizados para quantificação dos mioinositóis por cromatografia líquida de Alta Eficiência (HPLC, SHIMADZU - modelo SPD-

10A VP acoplado ao detector de índice de refração marca RID-6AD) utilizando a coluna de fase reversa C18 (Supelco, 30 cm x 4.5 mm de diâmetro). A fase móvel foi constituída de ácido fórmico, metanol, água, hidróxido de tetrabutyl amônia (44:54,5:1,5 v/v) em pH 4,25 e o fluxo coluna foi de 1.2 mL por minuto.

2.4. Ensaio Biológico

2.4.1. Ética

O experimento com animais foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo (CEUA 64/2010 UFV) de acordo com o guia de procedimentos do colégio Brasileiro de Experimentação Animal

2.4.2. Dietas

As dietas foram preparadas de acordo com as normas da AIN-93G (Reeves et al., 1993) (Tabela 1). A albumina foi utilizada como fonte proteica. Inicialmente todos os ingredientes foram misturados manualmente e depois foram misturados em uma bateadeira semi industrial (LIEME), com baixa rotação, por 30 minutos. As dietas prontas foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em geladeira a 10 °C. Todos os utensílios utilizados no preparo das dietas foram lavados com água deionizada e colocados de molho em ácido nítrico 10% over night e enxaguados quatro vezes com água deionizada (Ferreira e Gomes, 1995).

A concentração de Fe da dieta foi quantificada, após digestão das amostras com ácido nitroperclórico (3:1 v/v) e diluições apropriadas com água deionizada, por espectrofotometria de absorção atômica, modelo (GBC 908 AA) (Gomes, 1996).

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais da fase de Depleção e Repleção (g.100g⁻¹ de dieta)

Ingredientes	Depleção		Repleção	
	G1	G2	G3	G4
Albumina	20,00	20,00	16,74	15,84
Amido Dextrinizado	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de Soja	7,00	7,00	6,87	6,87
Celulose Microcristalina	5,00	5,00	2,12	1,87
Mistura Mineral	3,50*	3,50**	3,50*	3,50*
Mistura Vitamínica	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cistina	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho (qsp)	39,75	39,75	33,56	32,98
Feijão BRS Agreste	-	-	14,18	
Feijão BRS Pontal	-	-		12,45
FeSO ₄	-	12,00	-	-
Teor de Fe da dieta	4,05	14,20	13,06	13,10
Densidade Calórica	414,8	414,8	408,8	408,1

Fonte: Dieta padrão adaptada de Reeves et al. (1993). **Depleção**; **G1**: animais alimentados com dieta padrão sem adição de ferro durante 21 dias. **Repleção**; Animais alimentados com suas respectivas dietas por 14 dias, **G1**: Dieta padrão sem adição de Fe; **G2**: Dieta padrão com adição de Fe na forma de sulfato ferroso (FeSO₄), **G3**: Dieta padrão com adição de 12ppm de Fe oriundo do Feijão BRS Agreste, **G4**: Dieta padrão com adição de 12 ppm de Fe oriundo do Feijão BRS Pontal. * Mistura de minerais isenta de Fe. ** Mistura de minerais com FeSO₄. Concentração de Fe nas dietas em ppm após o preparo. Densidade calórica: Kcal. 100g⁻¹.

2.4.3. Delineamento experimental

A avaliação da biodisponibilidade de Fe foi realizada pelo método da AOAC (1998) e depleção/repleção com algumas adaptações. Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados com 21 dias de idade e peso inicial em torno de 58g. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada a 22 °C e ciclo claro e escuro de 12 horas.

No período de depleção (21 dias), todos os animais receberam dieta adaptada da AIN-93G (Reeves et al., 1993), isenta de Fe (Tabela 1) e água deionizada *ad libitum*, com o objetivo de induzir anemia Fepriva.

Na fase de repleção (14 dias), os animais anêmicos foram divididos em quatro grupos com oito animais em cada e receberam suas respectivas dietas experimentais com objetivo de recuperar os níveis de hemoglobina,

tempo durante o qual receberam água deionizada *ad libitum*, e ingestão de dieta controlada de aproximadamente 18 g por dia. As dietas foram preparadas para fornecer 12 mg Fe/kg de dieta procedente do sulfato ferroso (FeSO₄, dieta controle) e 12ppm de Fe procedente dos feijões biofortificados (dietas teste), e que ao serem analisados apresentaram teores próximos ao planejado (Tabela 1).

O peso dos animais e seu consumo alimentar foram monitorados semanalmente, durante as duas fases experimentais. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi determinado pela expressão que relaciona o ganho de peso total dos animais (g) pelo consumo total de dieta (g) x 100.

2.4.4. Determinação dos parâmetros hematológicos

Ao término do período de depleção, 21 dias, foram coletadas amostras de sangue por gotejamento, após incisão da porção terminal da cauda dos animais para a determinação da concentração de hemoglobina (g dL⁻¹). A dosagem de hemoglobina foi realizada segundo o método do cianetohemoglobina, utilizando-se o Kit de hemoglobina Bioclin®. A absorvância foi medida em um espectrofotômetro de luz UV visível (SHIMADZU UV-1601), segundo o protocolo da AOAC (1998). Nesse método, após secção da porção terminal da cauda de cada animal e gotejamento em vidro de relógio, 20µL de sangue foram misturados a 5mL de solução de cianeto e ferricianeto de potássio (solução de Drabkin), sendo o íon ferroso (Fe²⁺) da hemoglobina oxidado para o estado férrico (Fe³⁺) pelo ferricianeto de potássio formando metahemoglobina, que se combina com cianeto de potássio originando o cianeto de metahemoglobina, cuja concentração foi medida a 540nm em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601. A cor resultante dessa reação é proporcional a concentração de hemoglobina no sangue dos animais (Nelson e Morris, 1995). Para cálculo da concentração de hemoglobina das amostras de sangue foi utilizado como referência, o valor de leitura da absorvância de uma solução padrão de hemoglobina de concentração correspondente a 12 g/dL.

Após análise da hemoglobina os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais de modo que a diferença média da concentração de hemoglobina fosse o mais uniforme possível entre os grupos. Após o período de repleção (14 dias) os animais foram sacrificados e o sangue coletado por punção cardíaca e acondicionados em microtubulos com anticoagulante (EDTA, Vacuette, Campinas, Brazil) para contagem dos eritrócitos e posterior análise dos parâmetros hematológicos:

1 O Ganho de hemoglobina (GHb) foi calculado pela diferença da concentração da hemoglobina (Hb) do período final e inicial de repleção.

2 O pool de Fe da hemoglobina (Hb-Fe) foi calculado assumindo que o volume de sangue total do rato foi de 6,7% do peso total e o teor de Fe da hemoglobina de 0.335%:

3 Hb-Fe pool (mg) = [peso corporal (g) x Hb (g L⁻¹) x 6.7 x 0.335] /10.000

4 A eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE) e o valor biológico relativo (RBV) foram estimados de acordo com Manhoney, Van Orden and Hendricks (1974):

Eficiencia de Regeneração da Hemoglobina (HRE):

% HRE = mg Hb-Fe final - mg Hb-Fe inicial/Fe consumido (mg)

5 Valor Biológico Relativo (RBV):

RBV = 100 x (HRE (%) grupo teste / HRE (%) grupo controle)

2.5. Análise Estatística

Para análise dos resultados foi utilizado o programa Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 11.0, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (SAEG, 1998). Os dados foram interpretados por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias testadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3. Resultados e discussão

A análise da composição química dos feijões biofortificados com Fe revelou que os teores de carboidratos, proteínas, cinzas e lipídios (Tabela 2), estão compatíveis com valores encontrados em outros estudos que utilizaram feijões comuns cozidos (Antunes et al., 1995; Pires et al., 2005;

Pires et al., 2006; Ramírez- Cárdenas et al., 2008; Toledo et al., 2008; Lemos et al., 2009).

Tabela 2 - Composição química dos cultivares de feijão biofortificados

COMPONENTES	BRS PONTAL	BRS AGRESTE
Umidade (g 100 g ⁻¹)	8,20	8,40
Carboidratos totais (g 100 g ⁻¹)	39,80	40,60
Proteína bruta (g 100 g ⁻¹)	23,40	21,01
Lipídio (g 100 g ⁻¹)	0,97	1,10
Fibra alimentar total (g 100 g ⁻¹)	24,02	25,23
Insolúvel (g 100 g ⁻¹)	21,16	21,56
Solúvel (g 100 g ⁻¹)	2,86	3,67
Cinzas (g 100 g ⁻¹)	3,60	3,70
Potássio (mg 100 g ⁻¹)	1200,43	1200,50
Fósforo (mg 100 g ⁻¹)	390,00	430,10
Magnésio (mg. 100 g ⁻¹)	190,20	210,40
Cálcio (mg 100 g ⁻¹)	10,20	60,00
Ferro (mg 100 g⁻¹)	8,46 (5,99*)	9,64 (6,65*)
Zinco (mg 100 g ⁻¹)	4,17	2,96
Manganês (mg 100 g ⁻¹)	1,50	1,01

*Biodisponibilidade de Fe, baseada no $RBV_{HRE} = \text{Ferro total} \times \text{Biodisponibilidade relativa de Fe}$. Dados apresentados em 100g de farinha de feijões

Os feijões biofortificados com Fe apresentaram teores de Fe 20 a 50% maiores que diferentes variedades de feijões comuns pesquisadas por outros autores (Pires et al., 2005) (4,46 a 6,40 mg100g⁻¹); e Ramírez-Cárdenas et al., 2008 (4,52 a 7,77 mg 100g⁻¹). Esse resultado já era esperado, uma vez que os feijões estudados são biofortificados com Fe. Para ser considerado um cultivar biofortificado os grãos devem atingir uma concentração de Fe 50% superior a concentração de cultivares comuns, que apresentam concentração média de Fe em torno de 55 ppm (Welch et al., 2000). Em trabalhos desenvolvidos com germoplasma de feijão da coleção do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, Beebe et al. (2000) constataram que há variabilidade genética suficiente para aumentar em até 80% o conteúdo de Fe nos grãos, ou seja, a expectativa é que se desenvolvam feijões com concentração de Fe em torno de 100 ppm, concentração essa, considerada alvo para o projeto de biofortificação.

Tabela 3 – Ganho de peso (GP), Consumo Alimentar (CA), Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), Consumo de Ferro (Cons Fe), Valor de hemoglobina no início do período de repleção (Hb Inic).

Parâmetros Avaliados	Controles		Grupos teste		CV
	G1	G2	G3	G4	
GP (g)	24,14±3,08 ^b	40,29±8,04 ^a	40,14±5,01 ^a	39,0±1,53 ^a	14,49
CA (g)	172,5±28,7 ^c	208,4±13,8 ^a	186,6±13,8 ^{bc}	192,5±14,5 ^b	3,13
CEA (%)	14±0,08 ^b	19±0,05 ^a	21±0,04 ^a	20±0,06 ^a	14,17
Cons Fe (mg)	0,70±0,5 ^c	2,96±0,4 ^a	2,44±0,3 ^b	2,52±0,4 ^b	2,87
Hb Inic (g dL ⁻¹)	7,17±1,53	7,19±1,14	7,05±1,08	6,88±0,80	4,12

Os resultados foram expressos em médias ± DP para ratos anêmicos (n=8 por grupo) após um período de Repleção (14 dias) alimentados com dietas contendo 12ppm de Fe: **G1**: animais alimentados com dieta padrão sem adição de Fe. **G2**: animais alimentados com dieta padrão com adição de Fe na forma de sulfato ferroso (FeSO₄), **G3**: animais alimentados com dieta padrão com adição de Fe oriundo do Feijão BRS Agreste, **G4**: animais alimentados com dieta padrão com adição de Fe oriundo do Feijão BRS Pontal. Para cada característica avaliada, as medias seguidas de mesma letra nas linhas não apresentaram diferenças significativas, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A hemoglobina do início do período de repleção (Hb Inic) não diferiu entre os grupos, como esperado, uma vez que os animais foram agrupados de forma a manter homogênea a média de hemoglobina entre os grupos e assim garantir que todos os grupos experimentais iniciassem a fase de repleção em condições fisiológicas semelhantes, ou seja, com deficiência de Fe. A concentração de Hb do início do período de repleção foi em média de 7g dL⁻¹ (Tabela 3), suficiente para produzir deficiência de Fe, conforme recomendado por Forbes et al.(1989).

Os animais do grupo controle negativo (G1), dieta padrão sem adição de Fe, apresentaram menor (p≤0,05) GP, CA, Cons Fe e CEA em relação aos demais grupos. Tal fato foi em decorrência da anemia ferropriva, que provoca diminuição do apetite, e conseqüentemente comprometimento do desenvolvimento.

Não houve diferença entre os grupos testes (G3 e G4) para o GP, CA, CEA e Con Fe (Tabela 3). O consumo de Fe dos grupos testes (G3 e

G4) foi aproximadamente 5-8% menor ($p \leq 0,05$) que o controle positivo (G2) (Tabela 3), apesar de o consumo ter sido controlado.

A biodisponibilidade de Fe dos feijões biofortificados foi avaliada pelo método de depleção/repleção. Segundo Forbes et al. (1989) este método é um bom modelo para prever a biodisponibilidade de Fe, em comparação com as técnicas radioisotópicas, podendo ser usado para obter estimativas qualitativas da biodisponibilidade de Fe dos principais acessos classificados como genótipos promissores de alimentos biofortificados, reduzindo assim o número de genótipos que teriam que ser testados em humanos (Welch et al., 2000).

Na Tabela 4 estão apresentados os indicadores diretamente relacionados a biodisponibilidade do Fe nos diferentes tratamentos no período de repleção.

Durante o período de repleção o controle negativo (G1) continuou recebendo dieta pobre em Fe para certificar que a recuperação da hemoglobina dos grupos teste tenha sido devido ao tratamento e não a alguma fonte contaminante da dieta experimental. Após o período de repleção, o controle negativo não recuperou os níveis de hemoglobina sanguínea, ao contrário, houve redução de $1,04 \text{ g dL}^{-1}$ indicando que o tratamento foi efetivo na depleção de Fe nos animais (Tabela 4).

Tabela 4 – Ganho de hemoglobina (GHb), Valor biológico relativo do ganho de hemoglobina (RBV_{GHb}) Concentração de Fe da hemoglobina dos ratos no início (Fe Hb Inic) e no final do período de

repleção (Fe-Hb Fin), Eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE), Valor biológico relativo da eficiência de regeneração da hemoglobina (RBV_{HRE}).

Parametros Avaliados	Controles		Grupos teste		CV
	G1	G2	G3	G4	
GHb	-1,04 ±0,95 ^c	3,86±0,89 ^a	2,48±0,99 ^b	2,78±0,66 ^b	19,24
RBV _{GHb} (%)	-	100,00 ^a	64,00 ^b	72,00 ^b	13,47
Fe-Hb Inic*	2,15±0,49	2,29 ±0,29	2,15±0,36	2,21±0,23	7,85
Fe-Hb Fin	2,20±0,57 ^c	4,60±0,31 ^a	3,87±0,44 ^b	3,95±0,43 ^b	6,12
HRE (%)	6,48 ^b	78,17 ^a	70,83 ^a	68,97 ^a	22,15
RBV _{HRE}	-	100,0±0,15 ^a	90,6±0,26 ^a	88,2±0,22 ^a	16,43

Os resultados foram expressos em médias ± DP para ratos anêmicos (n=8 por grupo) após o período de Repleção (14 dias) alimentados com dietas contendo 12ppm de Fe e dieta isenta de Fe: **G1**: animais alimentados com dieta padrão sem adição de Fe. **G2**: animais alimentados com dieta padrão com adição de Fe oriundo do sulfato ferroso (FeSO₄), **G3**: animais alimentados com dieta padrão com adição de Fe oriundo do Feijão BRS Agreste, **G4**: animais alimentados com dieta padrão com adição de Fe oriundo do Feijão BRS Pontal. Para cada característica avaliada, as medias seguidas de mesma letra nas linhas não apresentaram diferenças significativas, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

O grupo controle positivo (G2) apresentou valor de Hb final dentro dos valores médios de Hb para roedores, 11g dL⁻¹ a 18g dL⁻¹ (Harkness & Wagner, 1993). O Ganho de hemoglobina diferiu entre os grupos testes (G3 e G4) e controle positivo (G2). O ganho de Hb dos grupos que receberam feijão agreste (G3) e pontal (G4) foi 36 e 28%, respectivamente, inferior (p≤0,05) ao controle positivo (G2). A diferença pode ter ocorrido em função do maior consumo de Fe pelo grupo controle. Assim, foi avaliado a relação entre o GHb e o consumo de Fe e ganho de peso (figura 1). O ganho de hemoglobina (GHb) foi positivamente correlacionado com o consumo de Fe. (*Spearman's* p = 0,8144 n=28, p<0,005), comprovando a nossa hipótese. Além disso, o ganho de peso (Tabela 4) também foi positivamente correlacionado ao GHb (*Spearman's* p = 0,4439 n=28, p<0,005), embora não tenha ocorrido diferença no ganho de peso dos animais entre controle positivo (G2) e grupos que receberam feijões biofortificados. Estes resultados corroboram com os resultados de Yokoi, et al (2008) que utilizaram o mesmo modelo experimental.

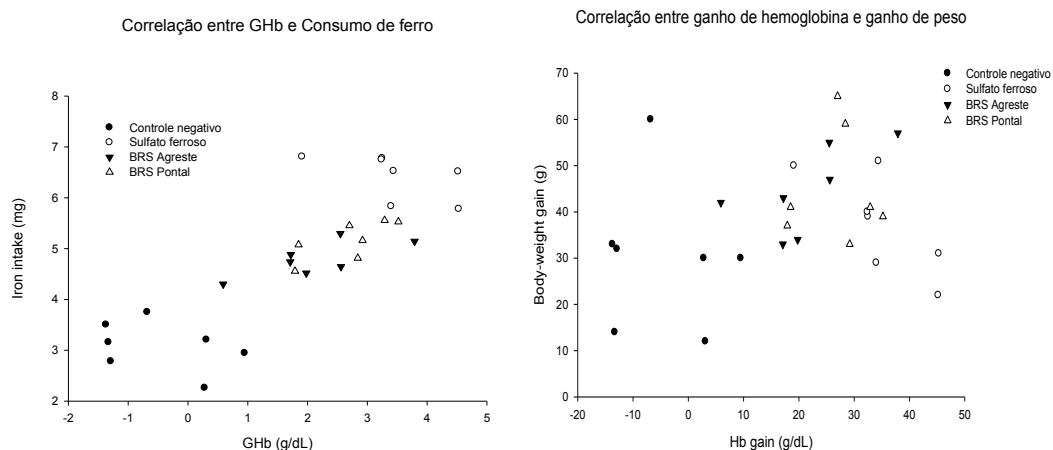


Figura 1 – A) Correlação entre ganho de hemoglobina (GHb) e consumo de Fe e ganho de peso de ratos deficientes em Fe recebendo dietas contendo sulfato ferroso, por 14 dias. **B)** Correlação entre ganho de hemoglobina (GHb) e ganho de peso de ratos deficientes em Fe recebendo dietas contendo sulfato ferroso, por 14 dias.

A biodisponibilidade de Fe pode ser inferida pelo teor de Fe incorporado à hemoglobina durante a fase de repleção (Haro-Vicente et al., 2009). Sendo assim, foi calculado a eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE). Esta não diferiu entre os grupos testes (G3 e G4) e o controle positivo (G2), comprovando a eficiência dos feijões em recuperar a Hb dos animais (Tabela 4).

Usando o valor biológico relativo do HRE (RBV_{HRE}) como indicador da biodisponibilidade de Fe obtido neste estudo, pode-se inferir que 100 g do feijão BRSP e BRSA cozido e seco fornecem 7,6 e 8,5 mg de Fe biodisponível o que corresponde a aproximadamente 45% das recomendações de ingestão diária de Fe para mulheres em idade fértil e 80 % da recomendações para crianças de 4 a 8 anos de idade (Tabela 5), segundo a Dietary Reference Intakes (DRI's) (IOM, 2001).

Tabela 5 - Contribuição dos feijões biofortificados para o suprimento das recomendações diárias de ferro para crianças e mulheres adultas, baseado no consumo de 100 g de feijão cozido e em base seca.

Feijões	Teor de Fe (mg/100g)	% Biodisponível Fe*	% de adequação da ingestão ¹	
			Mulheres	Crianças
BRS Pontal	8,46	88,2	41,5	74,6
BRS Agreste	9,64	90,6	48,5	96,4

*% da biodisponibilidade baseada no RBV_{HRE}. ¹ Calculado com base nas Recomendações Nutricionais Diárias (DRIs) de Fe para crianças com idade entre 4 e 8 anos, ambos os sexos (10mg) e mulheres adultas com idade entre 31 a 50 anos (18mg) (Instituto Americano de Medicina, 2001).

Esta quantidade de Fe é nutricionalmente significativa, uma vez que representa 40 a 80% da ingestão dietética recomendada (DRI's), em 100 g do produto cozido e seco. Segundo Bertolini e Fisberg (2010) as dietas podem ser classificadas em três categorias de biodisponibilidade, sendo consideradas como dieta com alta biodisponibilidade aquelas que apresentam biodisponibilidade acima de 19%. Desta forma os resultados do RBV_{HRE} descritos acima indicam que os dois feijões apresentaram biodisponibilidade equivalente a aquela obtida em refeições com alta biodisponibilidade.

Leguminosas como feijão apresentam compostos que podem interferir na biodisponibilidade de minerais, como fibras, taninos e fitatos, por isto eles foram investigados nas variedades de feijões biofortificados (Tabela 6).

Tabela 6 – Fatores fitoquímicos, Tanino e Fitato e Fibras expressos em g de feijão cozido em base seca.

Feijões	Taninos mg catequina g ⁻¹	IP6 + IP5 µmol g ⁻¹	Fitato/Fe µmol g ⁻¹	FDT (g g ⁻¹)	FDS (g g ⁻¹)
Pontal	3,7	15,5	10,2	0,24	0,028
Consumo	88,7	371,5	244,5	5,75	0,67
Agreste	2,7	11,9	6,9	0,25	0,036
Consumo	71,4	314,9	182,6	6,62	0,95

IP6 + IP5: Hexafosfato de mioinositol + Pentafosfato de mioinositol. **FDT:** Fibra Dietética Total. **FDS:** Fibra dietética Solúvel. **Consumo Repleção:** Consumo de feijão na dieta (g) durante o período de repleção (14 dias) multiplicado pelos fatores fitoquímicos presentes no feijão.

Os feijões biofortificados (BRS Pontal e Agreste) apresentaram, respectivamente, 24 e 25% de FAT, sendo que 15 e 13% foi de FAS e 85 e 87% de FAI (Tabela 2). Estes valores estão próximos aos encontrados por Londero et al., 2008 e Ramirez-Cardenas et al., 2008, que avaliaram diferentes cultivares de feijão comum utilizando a mesma metodologia. Essas frações solúveis e insolúveis da fibra alimentar podem apresentar diferentes efeitos fisiológicos na saúde humana (Rehman; Shah, 2004, Martino et al., 2012). A fibra alimentar ao se ligar a íons de minerais polivalentes pode exercer um efeito negativo na biodisponibilidade de alguns nutrientes, principalmente minerais (Torre et al., 1991) e proteínas. Os possíveis mecanismos para explicar essa interação seriam a diminuição do tempo de trânsito intestinal, o que provoca uma redução na absorção de minerais; diluição do conteúdo intestinal e aumento do volume fecal; formação de quelatos entre os componentes da fibra e os minerais; alteração do transporte passivo e ativo dos minerais através da parede intestinal; intercambio iônico; retenção de íons nos poros da estrutura gelatinosa de alguns tipos de fibra. Observa-se que a fibra pode interferir na biodisponibilidade de minerais, contudo, apenas nos casos em que a ingestão deles é deficiente (Ruis-Roso et al., 2001).

Nossos resultados não encontraram relação negativa entre o consumo de fibra presente nos feijões e biodisponibilidade de Fe em animais. Resultados semelhantes também foram encontrados por Catani et al. (2003), quando avaliaram efeito da celulose na absorção intestinal de Fe em ratos machos anêmicos durante a recuperação da anemia. Estes autores não observaram diferença significativa no ganho de peso (grupo de celulose = 132,8, controle = 128,0 g), Ganho de hemoglobina (grupo celulose = 8,0, controle = 8,0 g/dL), hemoglobina (grupo celulose = 12,3; controle = 12,1 g/dL) ou nos níveis de Fe hepático (celulose grupo = 333,6; controle = 398,4g /g tecido seco). Concluíram, portanto, que a celulose não afetou negativamente a regeneração da hemoglobina, o nível de Fe hepático ou o crescimento de ratos durante a recuperação da anemia por

deficiência de Fe. Weber et al. (2010) avaliaram o efeito da mistura de fibra dietética sobre o crescimento e absorção intestinal de Fe de ratos em recuperação de anemia por deficiência de Fe. Não observou efeito da adição de fibras sobre o crescimento e consumo de dieta e absorção intestinal de Fe em ratos que recuperam de anemia. Além disso, esta mistura favoreceu um aumento no peso de fezes e uma diminuição no pH cecal. O mesmo ocorreu quando Martino et al. (2011) avaliaram o efeito da fibra na biodisponibilidade de Fe em farinhas de soja com casca submetidas ao tratamento térmico (150 °C/30min).

Os taninos são considerados potentes inibidores da absorção de Fe e de outros minerais, como o Zn e o cálcio (Latunde-Dada & Neale, 1986). Hurrell et al. (1999) observaram uma redução de 50% a 70% na absorção de Fe em humanos, quando esses consumiram bebidas contendo cerca de 20 a 50 mg de polifenóis totais em 275 ml da bebida. Em feijões, os taninos estão localizados principalmente na casca e em pequena quantidade nos cotilédones (Santos, 2000) e sua quantidade em mg de catequina por g de feijão cozido e seco varia de 0,03 a 38,0 (Shimelis e Rakshit, 2007; De Mejía et al., 2003). O teor de taninos encontrado nos feijões biofortificados foi de 0,37% para o Pontal e 0,27% para o Agreste (Tabela 3). Segundo House e Van Campen (1994), a concentração de tanino nos feijões comuns quando excedem a concentração de 0,12% comprometem a absorção de Fe das dietas. Ao contrário dos resultados de House e Van Campen, a concentração de taninos encontrada nas cultivares biofortificadas em até 0,37% não interferiram na biodisponibilidade do Fe dessas cultivares em ratos.

O ácido fítico ou fitato é a forma de reserva de fósforo da planta para germinação e crescimento. A maior parte se encontra na forma de hexafosfato de mioinositol (81 a 89%), sendo 26 a 53% localizado no tegumento (Anton, 2008). No nosso estudo analisamos o teor de IP6 e o IP5, por serem as formas que mais se complexam com metais divalentes e formam compostos estáveis e insolúveis, prejudicando a biodisponibilidade de minerais. Os feijões biofortificados cozidos e secos apresentaram teores de fitato (IP6+IP5) variando de 0,8 a 1,0% (Tabela 3). A capacidade de absorção de Fe está associada a razão molar fitato: Fe (Lestiene et al.

(2005). Os feijões biofortificados apresentaram razão molar para o feijão agreste e pontal, de 6,9 e 10,2 respectivamente (Tabela 3). Embora a razão molar do feijão Pontal tenha sido 48% maior que a do Agreste, estes valores ainda estão abaixo do valor considerado prejudicial para a biodisponibilidade de Fe. Razão molar fitato:Fe >14 pode comprometer a biodisponibilidade de Fe em animais e humanos (Richard et al. 1997). Welch et al. (2000; 2002), verificaram em estudos com feijões convencionais tanto em animais quanto em humanos, que fitato não alterou a biodisponibilidade de Fe e Zn. Uma possível adaptação a altas concentrações de fitato nas refeições, provoca uma mudança no balanço negativo de Fe nos primeiros 5 dias de experimento e balanço positivo após 10 dias. Além da presença de microrganismos na microflora intestinal que poderia alterar este efeito do fitato na absorção do Fe.

Estudo com mulheres com baixo *status* de Fe, que avaliou a absorção de Fe por meio da incorporação de eritrócitos de isótopos estáveis de Fe, constatou-se que, apesar dos níveis de polifenóis e da razão molar ácido fítico / Fe semelhantes, a absorção do Fe do feijão biofortificado foi 40% menor do que a do Fe do feijão convencional, resultando em quantidades iguais de Fe absorvido (Petry et al., 2012). No entanto, um estudo comparativo, com feijão vermelho, incluindo variedades andinas, convencionais (49 mg Fe / g; "Low Fé") e biofortificados (71 mg Fe / g; "High Fe"), utilizando um modelo animal, revelou a eficiência de manutenção de hemoglobina e valores superiores de ferritina do fígado, no grupo tratado com os feijões biofortificados (Tako et al., 2011).

Ross e colaboradores (2000), avaliando a biodisponibilidade de Fe em 24 genótipos de feijões selecionados com diferentes concentrações de Fe, tanino e fitatos, em ratos radioensaiados observaram uma biodisponibilidade variando entre 53,1% e 76,2% dependendo do genótipo. Os autores observaram que genótipos de feijoeiro com concentrações mais elevadas de Fe resultaram em aumento da quantidade de Fe biodisponível para ratos. Não houve correlação significativa entre a concentração de Fe em diferentes genótipos de feijão e a biodisponibilidade em ratos atribuíveis às variações na IP5 + IP6 ou taninos, embora estes antinutrientes tenham variado muito (19,6-29,2 micromol de IP5 + IP6 g⁻¹, e 0,35-2,65 mg de

taninos g^{-1}) nas refeições do teste. Estes resultados corroboram com os encontrados neste estudo. No entanto, como a concentração de Fe dos feijões biofortificados é maior, a vantagem é que numa mesma porção consumida teremos maior quantidade de Fe biodisponível.

4. Conclusão:

Nossos resultados confirmaram que os feijões biofortificados, além de apresentarem uma boa fonte de proteínas e minerais, também possuem baixo teor de lipídios e boa quantidade das fibras alimentares total e solúvel, que podem trazer benefícios diversos á saúde.

Concluimos que a biodisponibilidade de Fe dos feijões biofortificados foi comparável á do sulfato ferroso e que, por isso, podem ser considerados um veículo promissor de Fe biodisponível. No entanto, experimentos em humanos também devem ser avaliados para comprovar sua eficácia.

5. Referências Bibliográficas

- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. (1998). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (16ed. rev. 4). Washington, D.C.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Portaria nº31, de 13 de janeiro de 1998.
- Cozzolino, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes. 2º edição, São Paulo: Manole, p. 509-866, 2007.
- Dietary Reference Intakes (DRI) for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Recommended Intakes for Individuals Elements. 2001. Washington, DC: National Academy Press.
- Felix, M. A. e Canniatti-Brazaca, S. G. Disponibilidade de ferro in vitro de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 8, 78-83. 2008
- Forbes, A. L., Arnaud, M. J., Chichester, C.O., Cook, J. D., Harrison, B. N., Hurrell, R. F., et al. Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 49, 225-238. 1989.
- Fritz, J., Pla, G., Harrison, B. N. & Clark, G. (1975) Estimation of the bioavailability of iron. *Journal. Assoc. Off. Analyse. Chemistry*. 58: 902–905.
- Gomes, J. C.; Silva, G. F. *Análises físico-químicas de alimentos*. Viçosa: Ed. UFV, v.2, 2011, 303.p.
- Grotto, H. Z. W. *Fisiologia e metabolismo do ferro*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo, 2010.
- Grotto, H. Z. W. *Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo, v. 30, n. 5, 2008.
- Haro-Vicente, J. F., Rez-Conesa, D., Braqueh, F.R. & Ros, G. (2009). Iron absorption and haemoglobin status of rats fed a ferrous bisglycinate-fortified growing-up milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2107-2114.
- Haro-Vicente, J., Pérez-Conesa, D., Rincón, F., Ros, G., Martínez-Graciá, C. & Vidal, M. (2008). Does ascorbic acid supplementation affect iron bioavailability

- in rats fed micronized dispersible ferricpyrophosphate fortified fruit juice? *European Journal of Nutrition*, 47(8), 470-478.
- HARVESTPLUS. Breeding crops for better nutrition. Washington DC, folder, 2004.
- Institute of Medicine. (2000). DRI – Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. National Academic Press, Washington, D.C. Disponível em URL: <http://www.nap.edu>.
- Hernández, M.; Sousa, V.; Moreno, A.; Villapando, S.; López-Larcón, M. Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different sources of iron. *The Journal of Nutrition*. v.133, p.154-159, 2003
- Instituto Adolfo Lutz. (2005). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. (4. Ed.) São Paulo.
- Nutti, Marília; Carvalho, José Luiz; Watanabe, Edson. A biofortificação como ferramenta para combater as deficiências em micronutrientes. Empraba Agroindústria de Alimentos.
- Miller, D. D., Schriker, B. R., Rasmussen, R. R. & Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34, 2248-2256.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C., JR. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on their formulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939-1951.
- Ross M., W.; William, A., H.; T.; Steven B.; Cheng, Z. (2000). Genetic Selection for Enhanced Bioavailable Levels of Iron in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3576-3580.
- Tako, E.; Laparra, J. M.; Glahn, R. P.; Welch, R. M.; Lei, X. G.; Beebe, S. M.; Dennis, D. (2009). Biofortified Black Beans in a Maize and Bean Diet Provide More Bioavailable Iron to Piglets Than Standard Black Beans: *The Journal of Nutrition*, 139, 305-309.
- Tan, S. Y. Yeung, C K.; Tako, E.; Glahn, R. P.; Welch, R. M. Lei, X.; Miller, D. D. (2008). Iron Bioavailability To Piglets From Red And White Common Beans (*Phaseolus Vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13), 5008–5014.
- Toaiari, S. D. A.; Yuyama, L. K. O.; Aguiar, J. P. L.; Sousa, R. F. S. (2005). Biodisponibilidade de ferro do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e da farinha de mandioca fortificada com ferro em ratos. *Revista de Nutrição*, 18, 291-299.

- Welch, R. M; House, W. A; Beebe, S.; Cheng, Z. (2000). Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal Agriculture Food Chemistre*, 48:3576–80.
- World Health Organization. Iron deficiency anaemia: assessment prevention and control. A guide for programme managers. Geneva: WHO; 2001.
- WHO - World Health Organization. (2008). World wide prevalence of anaemia 1993–2005. WHO global data base on anaemia. Geneva: WHO.
- Yokoi, K.; Konomi, A.; Otagi, M. (2009). Iron bioavailability of cocoa powder as determined by the Hb regeneration efficiency method. *British Journal of Nutrition*. 102: 215-220.
- Institute of Medicine. Dietary Reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington: The National Academy Press, 2001.
- Ellis R, Kelsay JL, Reynolds RD, Morris ER, Moser PB, Frazier CW. Phytate: zinc and phytate X calcium: zinc molar ratios in self-selected diets of americans, Asian Indians, and Nepalese. *J Am Diet Assoc*. 1987; 87(8):1043-7. [Links]
- Richard SE, Thompson LV. Interactions and biological effects of phytic acid. In: Shahidi F, editor. *Antinutrients and phytochemicals in food*. ACS symposium series, n 662. Washington (DC): American Chemical Society; 1997. Chapter 17: 294-312.
- Harkness JE, Wagner JE. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3.ed. São Paulo: Roca; 1993.
- Boaventura GT, Silva RHL, Tostes LF, Azeredo VB. Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de Quissamã, RJ, com ou sem suplemento alimentar alternativo. *Rev Nutr*. 2003; 16(3):321-31.

CAPÍTULO 3

BIODISPONIBILIDADE DE ZINCO E QUALIDADE FUNCIONAL DE FEIJÕES BIOFORTIFICADOS

RESUMO

O Zn é um mineral presente em mais de 200 enzimas diferentes, o que demonstra sua importância para o bom funcionamento do metabolismo. Dentre as funções dependentes deste nutriente, destacam-se as relacionadas ao metabolismo dos ácidos nucleicos, à divisão celular e ao crescimento. Apesar desta grande importância, o consumo de Zn costuma ser pequeno, em diversos grupos populacionais. Nos vegetais como as leguminosas a biodisponibilidade de Zn pode ser influenciada pela presença de substâncias inerentes nas leguminosas como as frações de fibras alimentares (solúvel e insolúvel), ácido fítico, e polifenóis (taninos) e assim reduzir a absorção destes elementos, devido ao efeito quelante que exercem em diferentes graus.

Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar a biodisponibilidade de Zn dos feijões biofortificados em ratos e o efeito funcional do feijão no organismo animal. Foram utilizados 50 ratos machos, divididos em cinco grupos experimentais com 10 unidades cada um, de acordo com o peso, sendo mantidos em suas respectivas dietas, tempo durante o qual receberam água deionizada ad libitum, e ingestão de dieta controlada, variando de 15 a 18 g por dia. O peso dos animais foi monitorado semanalmente bem como a ingestão alimentar, calculando-se assim o consumo, o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar. Os animais receberam dietas contendo 15 e 30ppm de Zn oriundos do carbonato de Zn ou dos feijões biofortificados com Zn. Após 42 dias, os ratos foram sacrificados por inalação com éter etílico e o sangue coletado por punção cardíaca. O plasma foi separado da massa eritrocitária para análise do Zn plasmático, Glicose, Colesterol, Triglicerídeos, TGO e TGP. O fêmur direito foi retirado para posterior análise da retenção mineral. A análise de Zn do fêmur dos ratos foi realizada por espectrometria de absorção atômica. A retenção mineral no fêmur dos ratos foi calculada

considerando a quantidade de mineral depositada no fêmur e a quantidade de mineral consumida durante o experimento. Observou-se que quanto maior a concentração de feijão na dieta, maior a concentração de fatores antinutricionais e conseqüentemente maior o prejuízo na retenção mineral de Zn. A biodisponibilidade de Zn dos feijões pode ser comparada a do carbonato de Zn até 50% de adição de feijão na dieta. Acima dessa concentração houve prejuízo no desempenho e retenção mineral no fêmur dos animais. Não houve relação entre a concentração de feijão e Zn nos parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil lipídico e glicêmico dos ratos.

1. Introdução

O desenvolvimento de feijão biofortificado com minerais é um exemplo importante da evolução do melhoramento genético (Welch et al., 2000). Essa estratégia de biofortificação do feijão com Zn (Zn) pode ser uma alternativa eficaz para aumentar a oferta de nutrientes e reduzir as deficiências de micronutrientes em populações de baixa renda, especialmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (Jons e Eyzaguirre, 2007). O Zn é um mineral essencial para o organismo, por ser o elemento traço crucial para funcionamento adequado de mais de 300 enzimas e ligado a processos celulares importantes como divisão e apoptose.

No entanto, o aumento na concentração mineral nos alimentos, por si só, pode não refletir um aumento proporcional no teor mineral absorvido, pois a biodisponibilidade dos minerais também é modulada pela concentração de compostos inibidores da absorção. O ácido fítico (fitato), e taninos são exemplos clássicos de nutrientes, encontrados em leguminosas que podem interferir na biodisponibilidade de minerais quer por inibição de enzimas, durante a digestão, ou pela interação direta com os minerais, diminuindo sua solubilidade e aumentando sua excreção (Sathe, 2002).

Dentre os compostos de fitato apenas o hexafosfato e o Pentafosfato de mioinositol (IP₆ e IP₅) exercem um efeito negativo sobre a biodisponibilidade de minerais. Nessa forma eles possuem em sua estrutura 6 e 5 íons fosfatos ligados aos carbonos da molécula que, por serem altamente eletronegativos no pH do lúmen intestinal, formam complexos insolúveis com minerais divalentes como o Zn, que precipitam e acabam sendo excretados nas fezes (Richard e Thompson, 1997; Sathe, 2002). Os outros compostos formados tais, como IP₃ e IP₄, têm baixa capacidade de ligação a minerais ou quando se ligam os complexos formados são mais solúveis.

Os taninos são conhecidos pela sua capacidade de se complexar a proteínas e minerais, diminuindo a digestibilidade e conseqüentemente o valor nutricional do alimento.

No entanto os Taninos e Fitatos e seus produtos de hidrólise, podem apresentar efeitos benéficos à saúde, baixando lipídios e glicose no sangue, quando fornecidos em baixos níveis na dieta. Esses compostos têm sido considerados como fatores de proteção contra o efeito dos radicais livres, em doenças como câncer e aterosclerose (Silva et al., 1999; Andrade et al., 2010; Yonekure e Susuki, 2003). Assim, o uso diário desses cultivares biofortificados para consumo humano, como parte de uma dieta equilibrada, pode ajudar a melhorar a saúde, prevenir ou minimizar várias doenças crônicas.

Para tanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a biodisponibilidade de Zn dos feijões biofortificados e verificar se a sua ingestão promoveu efeito funcional no organismo dos animais.

2. Material e Métodos

2.1. Cultivares de feijão

Foram utilizados dois cultivares de feijões biofortificados com Zn (BRS Agreste) variedade mulatinho e (BRS Pontal) variedade carioca. Esses cultivares foram desenvolvidos e fornecidos pelo programa de melhoramento de sementes da EMBRAPA - Arroz e Feijão de Goiás e EMBRAPA Agroindústria de Alimentos de Sete Lagoas. O Desenvolvimento de germoplasma para desenvolvimento de linhagens com alto teor de Zn foi realizado seguindo um protocolo de identificação, seleção e cruzamento entre os genótipos com altos teores de Fe e Zn em vários ambientes de avaliação, em ensaios com e sem repetição; avaliação e seleção de linhagens superiores em ensaios com repetições por quatro anos e finalmente identificação de novas cultivares, com registro, proteção e produção de sementes básicas.

2.1.1 Preparo da farinha de feijão

Os feijões foram selecionados, lavados e cozidos sob pressão na proporção de 1:2 (p:v) até atingir consistência macia, própria para o consumo e mínimo de água de cocção residual. Posteriormente os feijões foram secos em estufa de ventilação por 17 h à 60 °C e moídos em moinho

de faca (MAO 090 CFT), com peneira de espessura de 20 mesh (1.04mm) a 2000 rpm (12000 gs^{-1}). As farinhas foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos, rotulados e congelados a -12 °C até o momento do preparo das dietas experimentais.

2.1.2. Composição Química

A umidade foi determinada de acordo com os procedimentos descritos pelo Instituto Adolf Lutz (1985).

O teor de cinzas foi determinado seguindo as normas metodológicas da AOAC (1984).

A determinação do teor de minerais foi realizada em triplicata, de acordo com o método de Gomes (1996). Um grama de amostra de farinha de feijão foi pesado em uma balança analítica ao qual foram adicionados 10 mL de solução nitroperclórica (3:1 v/v). As amostras foram colocadas em bloco digestor com aquecimento e exaustão, sendo mantidas nesta condição até a formação de uma solução límpida. Após a digestão, o material foi transferido para balões volumétricos de 25 mL e o volume completado com água deionizada. O Zn foi determinado por espectrometria de absorção atômica. O cálcio (Ca) e o magnésio (Mg), foram determinados por ICP-Emission Spectroscopy. A concentração dos elementos foi calculada utilizando-se uma curva padrão com concentração conhecida para cada elemento analisado.

A determinação de proteínas foi realizada segundo método proposto por Kjeldahl para a quantificação de nitrogênio total segundo a AOAC (1984). O teor de nitrogênio da amostra foi convertido para proteína por um fator relativo ao teor de nitrogênio da proteína, que no caso das leguminosas é 6,25.

A extração dos lipídios foi realizada segundo o método intermitente Soxhlet (AOAC, 1984).

O teor de fibra alimentar total (FAT) e fibra alimentar insolúvel (FAI) foram determinados de acordo com o método enzimático gravimétrico (Prosky et al., 1988; AOAC, 1990). As fibras solúveis foram medidas pela diferença entre a FAT e FAI.

A determinação dos carboidratos foi realizada por diferença, sendo subtraída de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas, AOAC (1984).

A determinação da concentração de taninos foi realizada de acordo com o método de Price et al. (1978) e expresso em mg de catequina por g de amostra.

A extração e quantificação dos diferentes mio-inositol fosfatos foi realizada segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990) e o método cromatográfico (Ultra sep®, modelo ES 100 RP18, Leonberg, Alemanha), proposto por Sandberg e Ahderinne (1986).

2.2. Ensaio Biológico

2.2.1 Ética

O experimento com animais foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo (CEUA 64/2010 UFV) de acordo com o guia de procedimentos do colégio Brasileiro de Experimentação Animal

2.2.2. Dietas

As dietas foram preparadas de acordo com as recomendações da AIN-93G (15) com mistura mineral sem Zn (Tabela 1). As dietas foram ajustadas para fornecer dois níveis de Zn (15 e 30 mg Zn kg⁻¹ de dieta) procedente do Carbonato de zinco (ZnCO₃) (dietas padrão) ou dos feijões biofortificados cozidos e secos (dietas teste) (Tabela 1). A Caseína foi utilizada como fonte proteica, para completar em cada dieta o requerimento. A quantidade de feijão utilizada foi calculada para fornecer a quantidade necessária de Zn planejada. Para isso, foi necessário ajustar os valores das fibras para 15% e proteínas para 20%. Não foi possível formular uma dieta com 30ppm de Zn para o feijão BRS Agreste, pois iria desbalancear todos os outros macronutrientes.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais (g.100g⁻¹de dieta)

Ingredientes	Dietas Padrão		Dietas Teste		
	C 15	C 30	P 15	P 30	A 15
Feijões			35,97	71,94	50,5
Albumina	27,23	27,23	19,48	11,74	17,51
Amido Dextrinizado	13,2	13,2	13,2	2,78	9,75
Sacarose	10,0	10,0	10,0	2,14	7,4
Óleo de Soja	7,0	7,0	6,68	6,36	6,49
Celulose					
Microcristalina	15	15	7,07	0	3,33
Mistura Mineral*	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-Cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho (qsp)	22,52	22,52	2,55	0,0	0,0
**ZnCO ₃	1,5	3,0	0,0	0,0	0,0
Densidade Calórica	414,7	414,7	410,8	406,8	407,9

Fonte: Adaptado de Reeves et al. (1993). **C15:** Dieta padrão com adição de 15ppm de Zn na forma de ZnCO₃; **C30:** Dieta padrão com adição de 30ppm de Zn na forma de ZnCO₃; **P15:** Dieta padrão com adição de feijão BRS Pontal até atingir o nível de 15ppm de Zn; **P30:** Dieta padrão com adição de feijão BRS Pontal até atingir o nível de 30ppm de Zn; **A15:** Dieta padrão com adição de feijão BRS Agreste até atingir o nível de 15ppm de Zn.* Mistura de minerais isenta de Zn. **Carbonato de Zinco (Zn CO₃) mg/100g. Densidade Calórica: Kcal/100g de dieta

Inicialmente todos os ingredientes foram misturados manualmente e posteriormente foi utilizada uma bateadeira semi-industrial (LIEME), com baixa rotação, por 30 min. Todos os utensílios utilizados foram lavados com água deionizada. As dietas prontas foram embaladas em sacos de polietileno e armazenadas em geladeira a 10 °C.

2.2.3. Delineamento experimental

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), da linhagem *Wistar*, recém desmamados, com peso médio de 80g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de luz e temperatura controlada (25 °C) e ciclo claro escuro de 12 h, no laboratório de nutrição experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais com 10 unidades cada um, de acordo com o peso, sendo mantidos em suas

respectivas dietas, tempo durante o qual receberam água deionizada *ad libitum*, e ingestão de dieta controlada, variando de 15 a 18 g por dia. O peso dos animais foram monitorado semanalmente bem como a ingestão alimentar, calculando-se assim o consumo, o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA = ganho de peso (g) / Consumo alimentar (g) x 100).

Após 42 dias, os ratos foram sacrificados por inalação com éter etílico e o sangue coletado por punção cardíaca utilizando-se seringas descartáveis de 10 mL para cada animal. O plasma foi separado da massa eritrocitária para análise do Zn plasmático e o fêmur direito foi retirado para posterior análise da retenção mineral.

2.2.4. Retenção mineral no Fêmur

Após a coleta, os ossos foram limpos de todo tecido aderente, pesados em balança analítica, precisão (0,1 mg), e seus comprimentos e diâmetros determinados com paquímetro (resolução 0,2 mm).

A análise de Zn do fêmur dos ratos foi realizada por espectrometria de absorção atômica, após secagem e digestão em solução nitroperclórica 3:1 (v/v) e adequadas diluições em água deionizada. No fêmur ainda foram quantificadas Ca e Mg adicionando-se solução de cloreto de estrôncio hexahidratado após a digestão e antes da leitura (Gomes, 1996).

A retenção mineral no fêmur dos ratos foi calculada considerando a quantidade de mineral depositada no fêmur e a quantidade de mineral consumida durante o experimento.

Sendo assim: Retenção mineral = mg de Mineral no fêmur x100 / mg de Mineral ingerido total.

2.3. Parâmetros bioquímicos

2.3.1. Zinco plasmático

A concentração de Zn foi determinada no plasma dos animais por espectrometria de absorção atômica. O plasma coletado em microtubos heparinizados foi congelado até o momento das análises. A análise foi

realizada pelo laboratório de análises clínicas LabRed. A concentração de Zn plasmático foi expressa em $\mu\text{g dL}^{-1}$.

2.3.2 Glicose

A concentração de glicose sérica foi determinada no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de glicose mono reagente Bioclin®. A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na oxidação enzimática da glicose formando peróxido de hidrogênio que reage com a 4aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cuja intensidade de cor é proporcional a concentração a glicose. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490-550 nm no equipamento BS 200 (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®). A concentração de glicose sérica foi expressa em $\mu\text{g dL}^{-1}$.

2.3.3 Colesterol Total

A concentração de colesterol total foi determinada no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de colesterol mono reagente Bioclin®. A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na reação do peróxido de hidrogênio com a p-clorofenol originando um composto cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de colesterol. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490-550 nm no equipamento BS 200 (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®). A concentração de triglicerídeos foi expressa em $\mu\text{g dL}^{-1}$.

2.3.4 Colesterol HDL

A concentração de colesterol HDL foi determinada no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de colesterol HDL direto Bioclin®. A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia-se estabilização das lipoproteínas de baixa densidade, muito baixa densidade e dos quilomicrons pela adsorção de poliânion. Nesta condição a HDL se

solubiliza pela ação de um detergente, e permite ação enzimática sobre o colesterol ligado a ela. Desta forma, a intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de colesterol HDL na amostra. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 540-560 nm no equipamento BS 200 (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®). A concentração de colesterol HDL foi expressa em $\mu\text{g dL}^{-1}$.

2.3.5 Triacilglicerol

O teor de triacilgliceróis foi determinado no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de triglicérides líquidos estáveis Bioclin®. A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método baseia-se na reação do peróxido de hidrogênio com a 4-aminoantipiorina originando um composto cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de triacilglicerídeos. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490-550 nm no equipamento BS 200 (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®). A concentração de triglicérides foi expressa em $\mu\text{g dL}^{-1}$.

2.3.6 Alanina Amino Transferase (ALT)

A concentração de ALT foi determinada no plasma dos animais pelo método colorimétrico utilizando-se kit transferase ALT (TGP) cinético Bioclin®. A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na transferência do grupamento amina da alanina para o alfa cetoglutarato levando a formação de piruvato e glutamato. O piruvato é reduzido a lactato em presença do LDH formando NAD^+ . A velocidade de oxidação do NADH é proporcional a atividade da TGP da amostra. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm no equipamento BS 200 (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®). A concentração de ALT foi expressa em U L^{-1} .

2.3.6 Aspartato Amino Transferase (AST)

A concentração de alanina amino transferase (TGO) foi determinada no plasma dos animais pelo método colorimétrico utilizando-se kit

transferase AST (TGO) cinético Bioclin®. A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na transferência do grupamento amina do aspartato para o alfa cetoglutarato levando a formação de oxalacetato e glutamato. O oxalacetato é reduzido a malato em presença do MDH e o NADH é oxidado a NAD⁺. A velocidade de oxidação é proporcional a atividade da TGO da amostra. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm no equipamento BS 200 (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®). A concentração de AST foi expressa em U L⁻¹.

2.4 Análise Estatística

Os dados seguiram distribuição normal e posterior análise de variância (ANOVA) e teste de tukey para comparação entre os grupos com $P < 0,05$. A análise estatística foi calculada utilizando-se o software Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 11.0

3. Resultado e Discussão

3.1. Desempenho Nutricional

O desempenho nutricional dos animais foi avaliado pelo consumo da dieta, ganho de peso e CEA. No consumo total de dietas pelos animais, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos que consumiram as dietas padrão (C15 e C30). O mesmo foi observado quando se avaliou o consumo dos grupos que receberam feijão Pontal (P15 e P30). Nenhuma diferença significativa foi observada também no consumo dos animais que receberam dietas com 15 ppm de Zn (C15, P15 e A15). Houve diferença no consumo dos animais que receberam dieta com 30ppm de Zn (C30 e P30). O menor consumo foi observado no grupo que recebeu feijão Pontal (11,2%) com relação ao grupo que recebeu dieta padrão C30 (Figura 1).

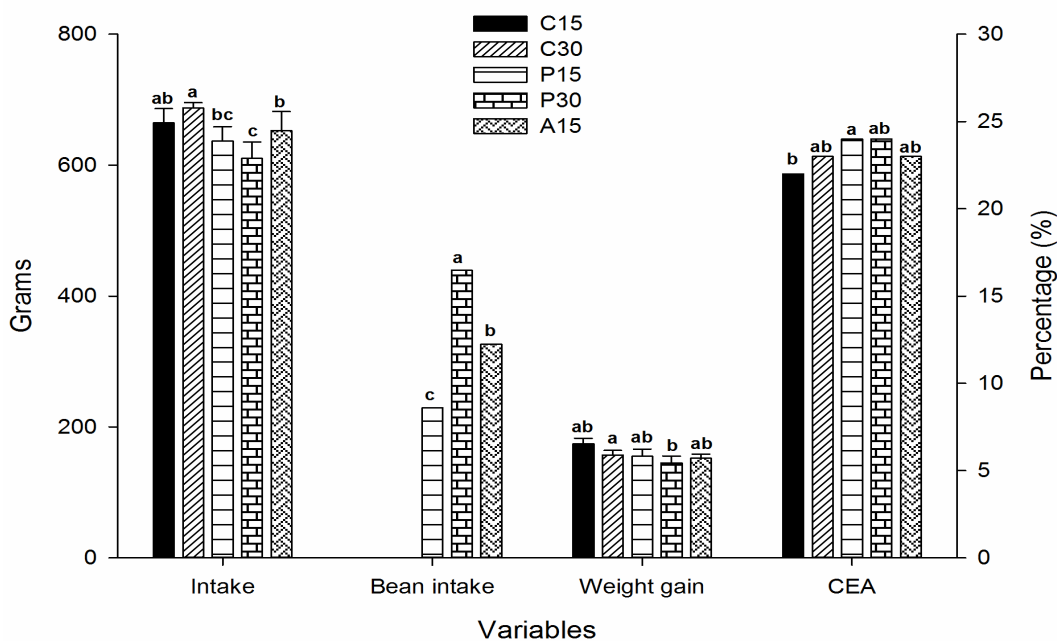


Figura 1 - Valores das variáveis consumo de dieta (g), consumo de feijão (g), ganho de peso (g), e CEA - Coeficiente de Eficiência Alimentar (%) de ratos alimentados com dietas com diferentes níveis de Zn: **C15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **C30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **P15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **P30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **A15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Agreste biofortificado com Zn; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação ao ganho de peso, não foram encontradas diferenças entre os grupos de animais que receberam dieta padrão com 15 e 30ppm de Zn, o mesmo ocorreu para os grupos de animais que consumiram dieta com feijão. Os grupos que receberam dieta com 15ppm de Zn não diferiram entre si. No entanto quando se comparou os grupos que receberam dieta com 30ppm de Zn, houve menor ganho de peso para o grupo que recebeu feijão Pontal. Esse menor ganho de peso pode ser entendido como consequência de um menor consumo de dieta como observado no grupo que recebeu feijão Pontal com 30ppm de Zn.

O menor consumo e consequentemente menor GP pode ser devido a presença de taninos no feijão (Tabela 2), já que o grupo P30 foi o

que recebeu maior concentração de feijão na dieta (70%). A partir do momento que adicionamos maior concentração de feijão, aumentamos também os teores de fibras, tanino e fitatos que podem interferir negativamente no crescimento, devido a interações com proteínas, carboidratos, enzimas e minerais (Desphande, 1982; Deshpande & Damodaran, 1990; Kaur & Kapoor, 1992). Os taninos que estão presentes em determinados alimentos, como as leguminosas, podem causar efeitos prejudiciais à dieta como reações de escurecimento enzimático e diminuição da sua palatabilidade, devido à adstringência. A adstringência é a sensação causada pela formação de complexos entre os taninos e as glicoproteínas salivares, o que pode aumentar a salivação, diminuir a aceitabilidade do alimento e conseqüentemente o consumo (Dawson et al., 1999). De acordo com Martin-Tanguy (1977), os taninos presentes em leguminosas podem afetar o crescimento de animais por duas razões: por seu sabor adstringente influenciando o consumo e, sua habilidade em se ligar a proteínas afetando a digestibilidade e inibindo a atividade enzimática (Oliveira et al., 2001).

Tabela 2 - Fatores Fitoquímicos: Tanino, Fitato e Fibras dietéticas expressos em g de feijão cozido em base seca.

Feijões	Taninos	IP6 + IP5	Fitato/Zn	FitatoxCa /Zn	FDS	FDI	FDT
Pontal	3,7	15,5	24,14	60,4	2,86	21,16	24,02
Agreste	2,7	11,9	26,73	395,6	3,67	21,56	25,23

Tanino (mg catequina g⁻¹). **IP6+IP5**: Hexafostato de mioinositol + Pentafostato de mioinositol (μmolg⁻¹), Razão molar **Fitato: Zn** (μmolg). Razão molar **FitatoxCalcio: Zn** (μmolg). **FDS**: Fibra dietética solúvel (g100g⁻¹), **FDI**: Fibra dietética insolúvel (g100g⁻¹), **FDT**: Fibra dietética total (g100g⁻¹).

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) diferiu entre o grupo que recebeu dieta padrão com 15ppm de Zn (C15) e o grupo que recebeu dieta com feijão Pontal (P15). Embora o consumo e ganho de peso não tenham diferido entre esses grupos, o CEA foi maior no grupo que recebeu dieta padrão com 15ppm de Zn oriundo do feijão Pontal (P15), demonstrando um possível efeito benéfico da adição de feijão para o crescimento e desenvolvimento dos animais já que os teores de Zn são semelhantes entre esses grupos.

3.2. Concentração de zinco no plasma

A concentração plasmática de Zn reflete rapidamente a variação deste elemento no organismo e é freqüentemente avaliada como marcador do status de Zn. No entanto não houve diferença na concentração do Zn plasmático em nenhum dos grupos avaliados. Esta metodologia vem sendo utilizada nos Estados Unidos desde 1976, e é o parâmetro mais utilizado nos estudos atualmente, sendo o único que possui valores de referência disponíveis, o que é muito importante para uma interpretação bem conduzida (Mason, 2004; Wada et al., 1985; Cozzolino, 1997). Todavia, alguns fatores podem interferir nos resultados desta avaliação sérica como o modelo circadiano e presença de inflamação ou infecção (Kasarskis e Schuna, 1980). É importante ressaltar que o Zn plasmático depende de carreadores protéicos, principalmente da albumina. Dessa forma, é provável que os níveis plasmáticos desse íon possam ser alterados por estados de hipoproteinemias, situação em que frações livres de Zn no plasma poderiam causar hiperzincemia relativa, o que não refletiria os reais níveis do oligo elemento no organismo (Person et al., 2004).

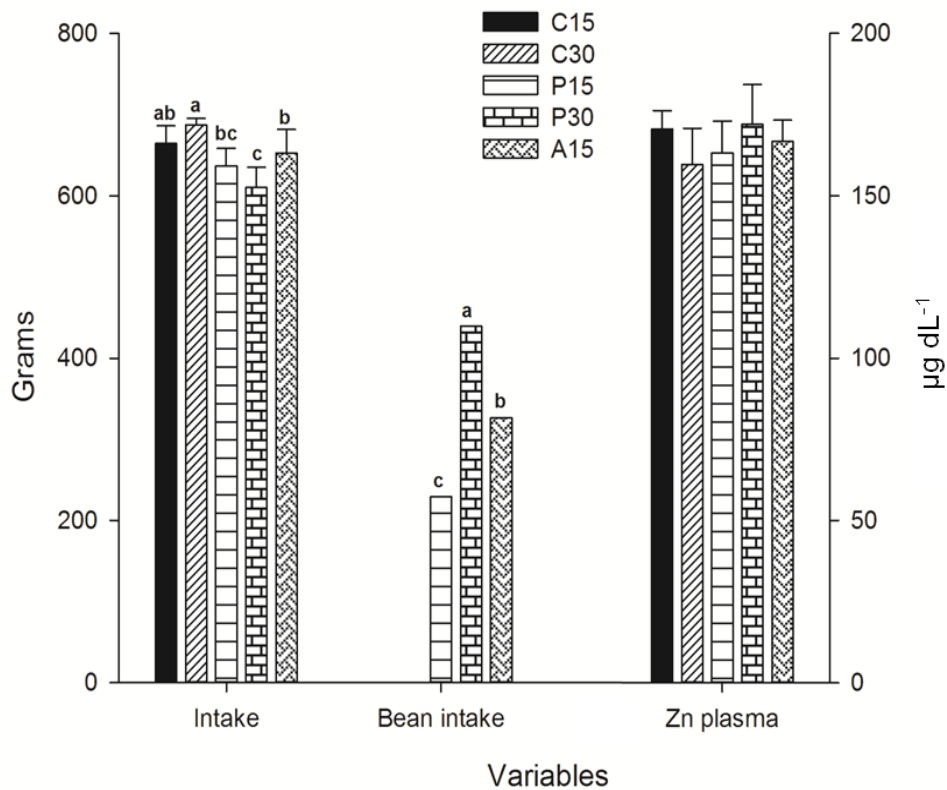


Figura 2 - Valores das variáveis consumo de dieta (g), consumo de feijão (g) e Zn plasmático (%) de ratos alimentados com dietas com diferentes níveis de Zn: **C15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **C30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **P15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **P30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **A15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Agreste biofortificado com Zn; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Concentração mineral no osso

A concentração de Zn no fêmur dos ratos, que receberam dieta com adição de feijão, não diferiram entre si (P15, P30 e A15). Entre os grupos que receberam dieta padrão também não foram observadas diferenças (C15 e C30). No entanto, houve diferença quando se comparou os grupos que receberam dieta padrão e os grupos que receberam dieta com feijão (Figura 2). Nos grupos que receberam dieta com 15 ppm de Zn (C15, P15 e A15) a concentração de Zn no fêmur foi 43% menor nos grupos que receberam dieta com adição de feijão. Quando se comparou os grupos que receberam 30 ppm de Zn (C30 e P30), houve redução de 29% do Zn no fêmur dos animais que receberam dietas com adição de feijão.

Observou-se, portanto que o fornecimento de 100% da recomendação diária de Zn na dieta não levou a um aumento proporcional na concentração de Zn no osso. Atingindo 100% da recomendação diária de Zn (na forma de feijão P30) também não houve mudanças, nem mesmo alcançou-se o resultado obtido com a grupo que recebeu a dieta padrão com 15 ppm de Zn (C15). Este resultado permite duas observações: o Zn presente no feijão não está tão biodisponível quanto o Zn da dieta padrão, ou que os compostos antinutricionais presentes no feijão podem ter afetado a sua biodisponibilidade.

No entanto, a concentração dos minerais, Ca e Mg no fêmur dos animais não diferiram entre os grupos. Importância do Ca e Mg no metabolismo ósseo do Zn.

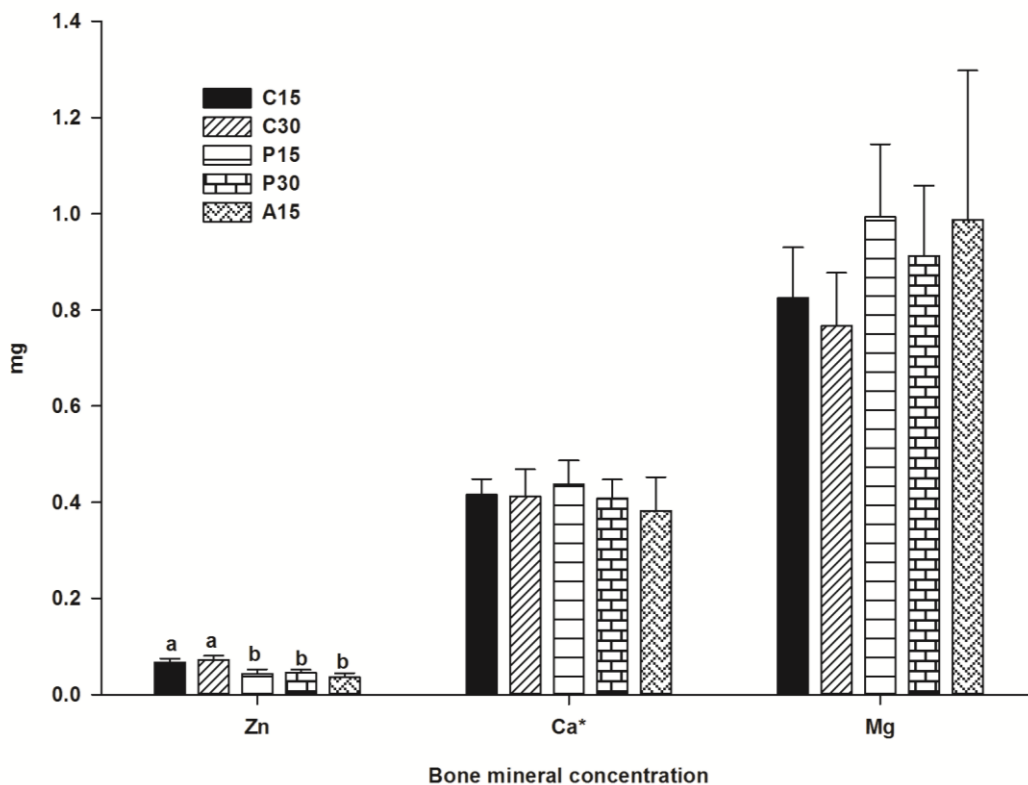


Figura 3 - Concentração dos minerais Zn (Zinco), Ca* (Cálcio mg/100) e Mg (Magnésio) no fêmur de ratos alimentados com dietas com diferentes níveis de Zn: **C15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **C30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **P15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **P30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **A15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Agreste biofortificado com Zn. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Retenção mineral

O aumento da ingestão de Zn na dieta dos animais diminuiu a retenção de Zn (Figura 1 e 4). Isto foi observado tanto nos grupos que receberam dietas padrão quanto nos grupos que receberam dietas com adição de feijão (Figura 4). Este resultado está de acordo com o metabolismo do Zn no organismo onde a eficiência da absorção diminuiu com o aumento da quantidade ingerida. Coppen e Davies (1987) descobriram que quando o Zn na dieta era aumentado de 5 para 40 mg kg⁻¹, a absorção de Zn era diminuída. Uma menor ingestão de Zn proporciona uma absorção mais eficiente e uma excreção fecal menor (Mason 2004). E

sabe-se que a homeostase é mantida graças a uma maior absorção dos animais com deficiência de Zn e aumento da excreção quando ingeridos em quantidades excessivas (Cotzias et al., 1962).

Foi observado que Jovens alimentados com uma fórmula dietética contendo 1,5 ou 15 mg de Zn /dia a absorção de Zn após 6 dias foi de 92% para a dieta com baixo teor de Zn e 81% para a dieta com alto teor de Zn (Istfan et al., 1983). Do mesmo modo, estudos realizados com isótopos estáveis em homens jovens e mostraram que a absorção de Zn da dieta foi de 53% quando a ingestão de Zn foi de 5,5mg dia⁻¹ e que diminuiu para 25% quando a ingestão foi de 16,5 mg dia⁻¹ (Wada et al., 1985). Portanto, parece que os mecanismos de homeostase *up* regulador da ingestão e absorção de Zn pode ter um efeito nos estudos de biodisponibilidade de Zn e sua retenção.

Quando foi fornecida a mesma dose de Zn, porém com fontes diferentes, dieta padrão e feijão, a retenção de Zn foi menor na dieta contendo feijão. Esse comportamento foi observado nos dois níveis estudados (Figura 4).

Um indicador utilizado para verificar a biodisponibilidade do Zn em determinado alimento é a razão molar entre fitato e Zn. Os feijões BRS Pontal e BRS Agreste apresentaram razão molar Fitato/Zn entre 24 e 26 μmol por g de feijão cozido e seco (Tabela 2). Esta razão molar igual ou maior a 20 pode produzir efeito negativo, impedindo a absorção e reduzindo a biodisponibilidade de Zn (Mafra e Cozzolino, 2004). Em ratos, uma razão molar fitato/Zn acima de 12 resultou em diminuição da biodisponibilidade do Zn, redução na velocidade de crescimento e na concentração de Zn tecidual dos animais (Salgueiro et al., 2000).

O teor de fitato presente nos feijões estudados foi suficiente para reduzir a biodisponibilidade de Zn nas dietas com adição de feijão, o que explicaria uma redução de 43% na retenção de Zn nos ossos dos animais alimentados com os feijões com 30 ppm de Zn quando comparados ao grupo que recebeu dieta padrão sem adição de feijão (C30) (Figura 1). Porém, quando avaliamos a retenção de Zn nas dietas com 15 ppm de Zn não houve diferença entre os grupos, indicando que, o aumento da

quantidade de feijão na dieta foi o fator decisivo para diminuição da retenção.

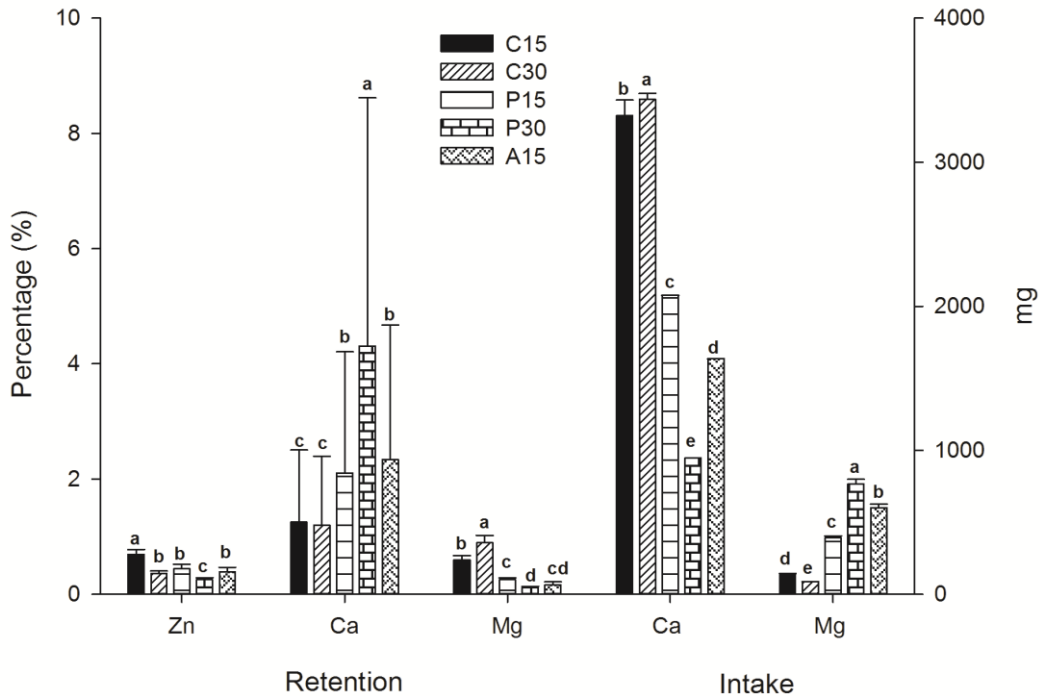


Figura 4 - Retenção e ingestão dos minerais Zn (Zinco), Ca (Cálcio) e Mg (Magnésio) no fêmur de ratos alimentados com dietas com diferentes níveis de Zn: **C15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **C30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **P15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **P30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **A15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Agreste biofortificado com Zn. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O consumo de Ca diferiu entre todos os grupos, apresentando valores maiores para os grupos que receberam dietas padrão. O menor consumo de Ca foi observado no grupo que recebeu 30 ppm de Zn procedente do feijão pontal (946,24 mg). Esta variedade de feijão continha menor concentração de Ca, por isso quando dobramos a quantidade de feijão na dieta (P30), houve redução da concentração de Ca ingerida (Figura 4).

A retenção de Ca dos animais não diferiu entre os grupos que receberam as dietas padrão e ambos os grupos consumiram maiores

quantidades de Ca na dieta (C15 e C30). Os grupos que receberam dieta contendo feijão Pontal e Agreste com 15ppm de Zn não diferiram entre si, porém o grupo que recebeu dieta padrão com feijão pontal com 30 ppm de Zn diferiu de todos os grupos, e apresentou maior retenção (4,3%). Este grupo foi o que consumiu menor quantidade de Ca. Todos os grupos que receberam dieta com feijão diferiram das dietas padrão e apresentaram maior retenção de Ca. Observou-se, portanto que o aumento do consumo de Ca diminuiu sua retenção de Ca, o que esta de acordo com o observado por vários autores que relataram que a eficiência da absorção diminui com o aumento da quantidade ingerida (Chan et al., 1995; Ilich e Kerstetter, 2000; Mcclung, 2003; Heaney, 2000). É sabido, a partir de estudos sobre o balanço de Ca, que esse mineral tem um efeito limiar, no qual acima de certo nível de consumo nenhum aumento de massa óssea é alcançado (Mcclung, 2003; Heaney, 2000). Portanto, a avaliação do consumo basal de Ca torna-se de extrema importância, dado que um consumo acima do limiar poderá não provocar um efeito adicional sobre o tecido ósseo (Bedani e Rossi, 2005)

Outro indicador utilizado no estudo da biodisponibilidade é a relação fitatoxCa/Zn. O valor encontrado neste estudo nos permite inferir que a biodisponibilidade de Zn dos feijões BRS Agreste foi muito inferior ao Pontal, o que é questionável, pois a retenção de Zn no osso dos animais não diferiu (Tabela 2). Essa diferença da relação molar fitatoxCa/Zn entre os feijões pode ter sido influenciada pela grande diferença do teor de Ca presente nos feijões (10mg e 60mg.100g⁻¹) (Tabela 1).

A interação entre o Zn e Ca parece ocorrer nos dois sentidos e ser dependente da quantidade de mineral fornecida (Wood e Zheng, 1997; Spencer et al. 1987). Outros estudos sugerem que o efeito inibitório seja pela presença conjunta de fitato nas refeições. Geralmente, os cátions divalentes como Ca, Zn, Fe e Cu formam com o ácido fítico, sais insolúveis penta e hexa substituídos (Torre et al.,1991). No entanto, o complexo insolúvel ácido fítico-Ca pode contribuir para reduzir ainda mais a biodisponibilidade de outros minerais, como o Zn (Cozzolino, 2005). Este mineral ao ligar-se ao complexo ácido fítico-cálcio pode formar complexos muito estáveis e insolúveis (Zhou & Erdman, 1995). Sugere-se que uma

relação molar $\text{Ca} \times \text{fitato} / \text{Zn} > 200 \mu\text{mol}/1000 \text{ kcal}$ possa ocasionar problemas em dietas pobres em Zn e que contenham grandes quantidades de fitato (Ellis et al., 1987). Cozzolino (2005) relata que na presença de Ca, o complexo cálcio: fitato/Zn pode afetar adversamente o balanço de Zn em humanos, ocasionando problemas em dietas vegetarianas.

O consumo de Mg, bem como sua retenção diferiu entre todos os grupos. Sendo o maior consumo (766mg) observado no grupo que recebeu a dieta com 30 ppm de Zn oriundo do feijão (P30) e o menor consumo (85mg) no grupo que recebeu dieta padrão com 30 ppm de Zn (C30). A maior retenção (0,89%) foi observada no grupo que recebeu dieta padrão com 30 ppm de Zn (C30) e a menor retenção (0,12%) foi do grupo que recebeu dieta com 30 ppm de Zn oriunda do feijão (P30). Observamos que o mesmo fenômeno que ocorreu com o Ca e Zn se repetiram com o Mg, ou seja, o aumento do consumo do Mg nos grupos que receberam dieta padrão levou a uma diminuição da retenção, o mesmo ocorreu com os grupos que receberam dieta com adição de feijão, onde a diminuição do consumo de Mg levou a um aumento da retenção do mesmo (Figura 4 - P15, A15 e P30).

3.5 Desenvolvimento ósseo

Independente da dieta utilizada não foram observadas diferenças no peso e no diâmetro do fêmur dos ratos. (Figura 3). No entanto, o comprimento do fêmur dos animais diferiu entre os grupos que receberam 30 ppm de Zn. Uma redução de 4% no comprimento foi observada no grupo que recebeu dieta padrão com adição de feijão em relação ao grupo com dieta padrão sem feijão (C30 e P30). Não foram observadas diferenças entre os grupos que receberam dieta com 15 ppm de Zn (Figura 3). O menor valor do comprimento do fêmur observado nos animais do grupo P30 pode ser devido ao efeito da grande quantidade de feijão adicionado a dieta padrão (72%). Esse foi o grupo que recebeu maior concentração de feijão por Kg de dieta e conseqüentemente maior teor de fatores antinutricionais como fitato e taninos.

O alto teor de fitatos e taninos da dieta P30 pode ter interferido negativamente na biodisponibilidade de Zn e de outros minerais relacionados com o crescimento ósseo como Ca e Mg. O fitato tem habilidade de formar quelantes com íons de minerais, tais como o Ca e Mg, formando complexos insolúveis resistentes à ação do trato intestinal, que diminuem a disponibilidade desses minerais e, embora esse seja seu maior efeito, os fitatos também interagem com resíduos básicos das proteínas, participando da inibição de enzimas digestivas como a pepsina, pancreatina e a alfa-amilase (Bonett et al, 2007; Benevides et al., 2011) diminuindo o valor nutricional dos feijões.

Os taninos também têm atividade anti-amilásica, dificultando a digestão dos carboidratos além de associar-se e precipitar as proteínas por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Serrano e Goñi, 2004). Como consequência dessas possíveis interações, observou-se também que além do comprimento do fêmur, o ganho de peso e a retenção de Zn e Mg no fêmur foram consideravelmente menores no grupo P30 em comparação com os do grupo que recebeu dieta padrão com 30 ppm de Zn sem adição de feijão (C30).

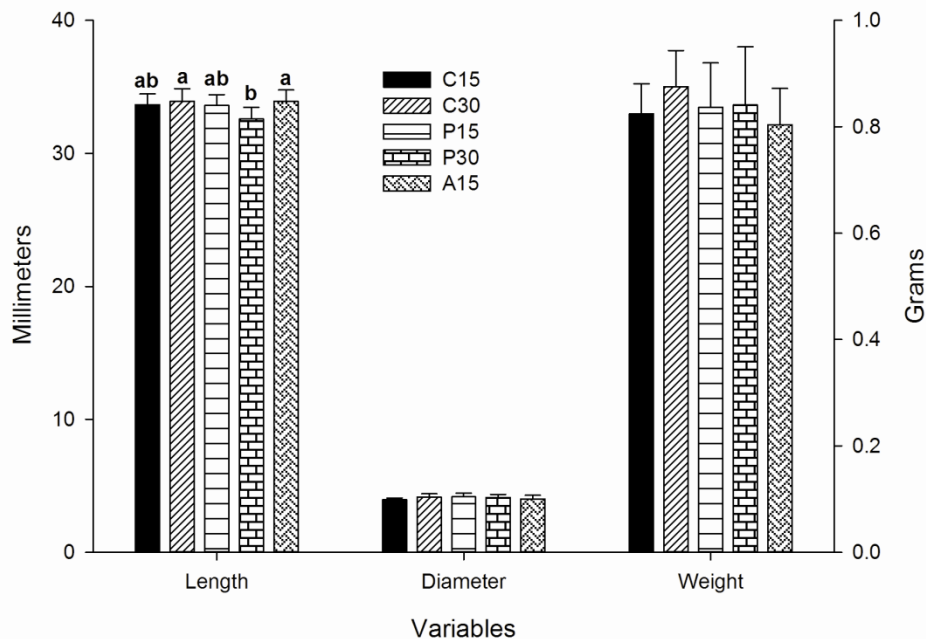


Figura 5 - Medidas dos parâmetros de desenvolvimento ósseo Comprimento (mm), diâmetro (mm) e peso (g) dos ratos alimentados com dietas com diferentes níveis de Zn: **C15**: Dieta

padrão com 15 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **C30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **P15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **P30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **A15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Agreste biofortificado com Zn. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6 Qualidade Funcional do Feijão

A qualidade funcional do feijão foi avaliada pelas determinações de glicose, colesterol total, HDL, triglicerídeos, TGO e TGP sanguínea, onde não foram encontradas diferença estatística entre os grupos que receberam dieta padrão e os grupos que receberam dieta com diferentes concentrações de feijão (Figura 6). O efeito hipocolesteremiante (Rosa et al., 1998, Ramirez-Cárdenas et al., 2008; Martino et al., 2012) e hipoglicemiante do feijão (Knott et al., 1992; Lujan et al., 2008; Geil et al., 1995) tem sido relatado na literatura, porém nenhum resultado foi observado nesse experimento. Mesmo não sendo observado efeito positivo do feijão nos parâmetros bioquímicos dos animais em nosso experimento, graças às suas comprovadas propriedades nutritivas e terapêuticas, é consenso na literatura que o feijão é altamente desejável como componentes em dietas no combate à fome e à desnutrição. Interessante também foi que não encontramos efeitos negativos em nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados.

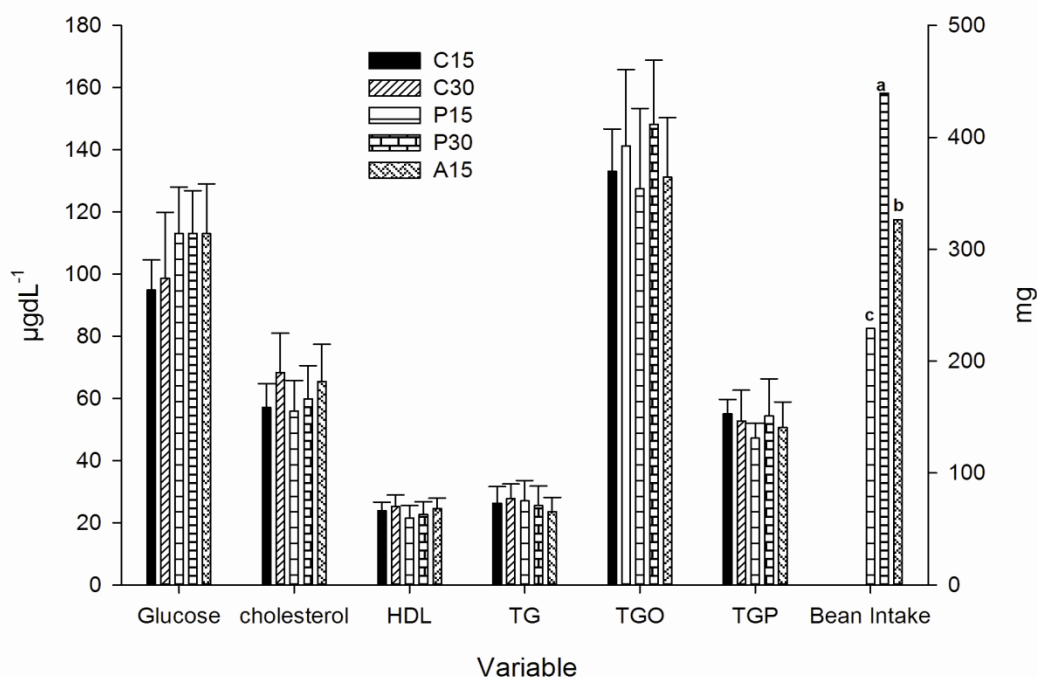


Figura 6 - Valores das variáveis consumo de feijão (mg), Glicose, Colesterol, HDL, Triacilglicerol, TGO e TG de ratos alimentados com dietas com diferentes níveis de Zn: **C15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **C30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn na forma de carbonato de Zn; **P15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **P30**: Dieta padrão com 30 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Pontal biofortificado com Zn; **A15**: Dieta padrão com 15 ppm de Zn oriundo da adição de feijão Agreste biofortificado com Zn; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Além disso, a complementação proteica quando o feijão é combinado com cereais, especialmente o arroz, disponibiliza os oito aminoácidos essenciais ao nosso organismo. Além do seu conteúdo protéico, o elevado teor de fibra alimentar, com seus reconhecidos efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, aliado às vitaminas (especialmente do complexo B) e aos carboidratos, tornam o seu consumo altamente vantajoso como alimento funcional, representando importante fonte de nutrientes, de energia e atuando na prevenção de distúrbios cardiovasculares e vários tipos de câncer (Aidar, 2013; Martino et al., 2012). Estudos sobre o valor nutricional do feijão foram realizados, durante

muitos anos, mas ainda faltam pesquisas sobre os teores de compostos que estão em baixas concentrações, bem como estudos experimentais para verificar o potencial efeito de diferentes cultivares de feijão para modificar fatores de risco de doenças crônicas e para modular os mecanismos fisiopatológicos envolvidos (Martino et al., 2012).

4. Conclusão

Observou-se que quanto maior a concentração de feijão na dieta, maior a concentração de fatores antinutricionais e, conseqüentemente, maior o prejuízo na retenção mineral de Zn.

A biodisponibilidade de Zn dos feijões pode ser comparada á do carbonato de zinco em dietas com até 50% de adição de feijão e com até 15 ppm de Zn. Acima dessas concentrações, houve prejuízo no desempenho e na retenção mineral no fêmur dos animais.

Não houve relação entre a concentração de feijão e Zn na dieta e os parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil lipídico e glicêmico dos ratos.

5. Referências Bibliográficas

- Aidar, H. Características da Cultura, disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>> acessado em 10 de maio de 2013.
- Andrade, G. F.; Dantas, M. I. S.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Costa, N. M. B.; Martino, H. S. D. Revista Instituto Adolfo Lutz 2010, 69, 541-548.
- Association of Official Analytical Chemists – Official methods of analysis. 14. ed. Arlington: A.O.A.C., 1984. 1141p.
- Bedani, R.; Rossi, E.A. Semina: Calcium intake and osteoporosis. Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 26, n. 1, p. 3-14, jan./jun. 2005
- Benevides, C.M. J.; Souza, M. V.; Souza, R. D. B.; Lopes, M. V. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, 18 (2): 67-79, 2011
- Bonett, L. P., Baumgartner, M. S. T., Klein, A. C., Silva, L. I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 235-246, set/dez. 2007.
- Brune, M., Rossander-Hultén, L., Hallberg, L., Gleerup, A., Sandberg, A. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. Journal of Nutrition, Bethesda, v.122, n.3, p.442-449,1992.
- Chan, G. M.; Hoffman, K.; McMurry, M. Effects of dairy products on bone and body composition in pubertal girls. Journal of Pediatrics, St Louis, v. 126, p. 551-556, 1995.
- Coppen, D. E. & Davies, N. T. (1987) Studies on the effects of dietary zinc dose on ⁶⁵Zn absorption in vivo and on the effects of Zn status on ⁶⁵Zn absorption and body loss in young rats. Br Journal. Nutrition. 57: 35–44.
- Cotzias George C, Borg D C, Selleck B. Specificity of zinc pathway through the body: turnover of ⁶⁵Zn in the mouse. American Journal Physiology. 1962, 202:359-63
- Cozzolino, S.M.F. Biodisponibilidade de minerais. Revista de Nutrição, n.2, v.10, p.87- 98, 1997.
- Dawson, J.M.; Buttery, P.J.; Jenkins, D.; Wood, C.D.; Gill, M. Effect of dietary quebracho tannin on nutrient utilization and tissue metabolism in sheep and rats. v.79, p.1423-1430, 1999.
- Deshpande, S.S., Damodaran, S. Food legumes: chemistry and technology. Advances in Cereal Science and Technology, Manhattan, v.10, p.147-241, 1990.

- Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. Interactions of tannic acid and catechin with legume starches. *Journal of Food Science*, Chicago, v.47, n.6, p.2080-2083, 1982.
- Ellis R, Kelsay JL, Reynolds RD, Morris ER, Moser RB, Frazier CW. Phytate: zinc and phytate x calcium : zinc millimolar ratios in self-selected diets of Americans, Asian Indians and Nepalese. *J Am Diet Assoc* 1987; 87: 1043-7.
- Geil, P.B. and J.W. Anderson, 1994. Nutrition and health implications of dry beans: A review. *J. Am. College Nutr.*, 13: 549-558.
- Gomes, J. C. Análises de alimentos. Universidade Federal de Viçosa: Ed. UFV. 1996. 126.p.
- Heaney,R.P. Calcium, dairy products, and osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition* 19,83S–99S, 2000.
- Ilich, J. Z.; Kerstetter, J. E. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, New York, v. 19, p. 715-737, 2000.
- Instituto Adolfo Lutz (IAL). Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3.ed. São Paulo, v.1, 533p, 1985.
- Istfan, N. W, Janghorbani, M. & Young, V. R. (1983) Absorption of stable ^{70}Zn in healthy young men in relation to zinc intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 38, 187-194.
- Jons, T; Eyzaguirre, P.B. Biofortification, biodiversity and diet: A search for complementary applications against poverty and malnutrition. *Food Policy*, v.32, p. 1– 24, 2007.
- Kasarskis, E. J., Schuna, A. Serum alkaline phosphatase after treatment of zinc deficiency in humans. *Am J Clin Nutr* v.33:, n.12, p. 2609-12, 1980
- Kaur, D., Kapoor, A.C. Nutrient composition and antinutritional factors of rice bean (*Vigna umbellata*). *Food Chemistry*, Barking, v.43, n.2, p.119-124, 1992.
- Knott, R.M., Grant, G., Bardocz, S., Pusztai, A., Carvalho, A.F.de F.U. & Hesketh, J. Alterations in the level of insulin receptor and Glut-4 mRNA in skeletal. *Int.J. Biochem.* 1992, 24,897-902
- Lonnerdal, B., Sandberg, A., Sandstrom, B., Kunz, C. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.119, n.2, p.211-214, 1989.
- Lujan, Dagnith Liz Bejarano; Leonel, Alda Jusceline; Bassinello, Priscila Zaczuk and Costa, Neuza Maria Brunoro. Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade proteica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2008, vol.28.
- Mafrá, D.; Cozzolino, S.M.F. Importância do Zinco na Nutrição Humana. *Revista de Nutrição*, n.1, v.17, p.79-87, 2004.

- Martino, H.S.D; Bigonha, S.M.; Cardoso, L.M.; Rosa, C.O.B.; Costa, N.M.B.; Ramíres Cárdenas, L.L.A.; Ribeiro, S.M. Nutricional and Bioactive Compounds of Bean. Benefits to Humans Health Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds. p.233-258.
- Martin-Tanguy, J., Guillaume, J., Kossa, A. Condensed tannins in horse bean seeds: chemical structure and apparent effects on poultry. *Journal of the Science and Food Agriculture, Oxford*, v.28, n.8, p.757-765, 1977.
- Mason, J. B. Consequences of altered micronutrient status. In: Goldman, L; Ausiello, D. Cecil textbook of Medicine. Single Volume.p.1326-1336, 2004.
- McClung, M. R. Prevention and management of osteoporosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, London*, v. 17, p. 53-71, 2003.
- Nutti, Marília; Carvalho, José Luiz; Watanabe, Edson. A biofortificação como ferramenta para combater as deficiências em micronutrientes. Embrapa Agroindústria de Alimentos.
- Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15. ed. Washington, D.C: AOAC International, 1990, p. 800-801; 1105-1106.
- Oliveira, A. C., Queiroz, K. S.; Helbig, E.; Reis, S. M. P. M.; Carraro, F. O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência, rafinose, estaquiose e verbascose. *Archivos Latinoamericanos de Nutrição, Caracas*, v. 51, n. 3, p. 276-283, 2001.
- Person, Osmar Clayton; Nardi, José Carlos and Feres, Maria Cristina Lancia Cury. A relação entre hipozincemia e zumbido. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* [online]. 2004, vol.70, n.3
- Prince, M.L.; Scoyoc, S.V.; Butler, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food. Chem.* v. 25 (5), p. 1214-1218, 1978.
- Ramírez-Cárdenas, L.; Leonel, A. J.; Costa, N. M. B. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2008, 28, 200-213.
- Ramírez-Cárdenas, L.; Leonel, A.J.; Costa, N.M.B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "AIN-93 - Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." *Journal of Nutrition* 123(11): 1939-51.
- Rosa C.O., Costa N.M., Nunes R.M., Leal P.F. (1998). The cholesterol-lowering effect of black, cariocinha and red beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) in hypercholesterolemic rats. *Arch. Latinoam. Nutr.* 48 (4): 306-10.

- Salgueiro MJ, Bioch MZ, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, Paoli TD, et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr Res.* 2000; 20(5): 737-55.
- Sandeberg, A E Ahderinne, R. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates in food and intestinal contents. *Journal of Food science*, v.51, p. 547-550, 1986.
- Sathe, S. K. Dry Bean Protein Functionality. *Crit. Rev. Biotechnol.*, Inglaterra, v. 22, n. 2, p. 175-223, 2002.
- Serrano, J.; Goñi, I. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de La población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 54, p. 36-44, 2004.
- Spencer H, Rubio N, Kramer L, Norris C, Osis D. Effect of zinc supplements on the intestinal absorption of calcium. *J Am Coll Nutr* 1987; 6: 47-51.
- Torre, M., Rodriguez, A.R., Saura-Calixto, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.1, n.1, p.1-22, 1991.
- Wada, L., Turnlund, J. R. & King, J. C. (1985) Zinc utilization in young men fed adequate and low zinc intakes. *J. Nutr.* 115: 1345–1354.
- Weaver, C. M.; Kannan, S. Phytate and mineral bioavailability. In: Reddy, N. R.; Sathe, S. K. (Eds.). *Food phytates* Florida: CRC, 2002. p. 211-223.
- Welch, R. M.; House, W. A.; Beebe, S.; Cheng, Z. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, 3576-3580.
- Wood RJ, Zheng JJ. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1803-9.
- Zhou, J.R., Fordyce, E. J., Raboy, V., Dickinson, D.B., Wong, M.S., Burns, R.A., Erdman, J.W. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.122, n.12, p.2466-2473, 1992.