

SÂMARA LETÍCIA SILVA DE LIMA

**FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.): AÇÃO DO ARMAZENAMENTO
SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL E EFEITO *IN VIVO*
DA FARINHA INTEGRAL E DE SEU HIDROLISADO PROTEICO NO
ESTRESSE OXIDATIVO E NA INFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L732f
2017

Lima, Sâmara Letícia Silva de, 1991-
Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) : ação do armazenamento sobre a composição química e nutricional e efeito in vivo da farinha integral e de seu hidrolisado proteico no estresse oxidativo e na inflamação / Sâmara Letícia Silva de Lima. - Viçosa, MG, 2017.
xviii, 128f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.92-123.

1. Feijão. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Alimentos - Armazenamento. 4. Amido. 5. Hidrolisados de proteína. 6. Peptídeos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

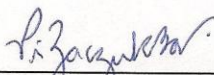
CDD 22 ed. 635.652

SÂMARA LETÍCIA SILVA DE LIMA

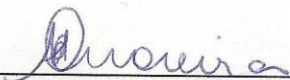
**FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.): AÇÃO DO ARMAZENAMENTO
SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL E EFEITO *IN VIVO*
DA FARINHA INTEGRAL E DE SEU HIDROLISADO PROTEICO NO
ESTRESSE OXIDATIVO E NA INFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

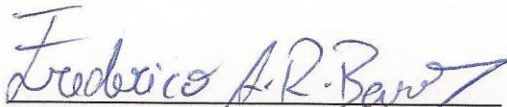
APROVADA: 24 de fevereiro de 2017.



Priscila Zaczuk Bassinello



Maria Eliza de Castro Moreira
(Coorientadora)



Frederico Augusto Ribeiro de Barros
(Coorientador)



Renata Celi Lopes Toledo
(Coorientadora)



Hércia Stampini Duarte Martino
(Orientadora)

*Dedico este trabalho com todo o meu amor e gratidão
a Deus, aos meus pais Eroneide e Regival, aos meus
irmãos Lucas e Regival Junior, aos meus sobrinhos
Miguel e Murilo e ao meu companheiro Fernandes
Wilson.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora, Santo Expedito e a todos os seus anjos que sempre cuidaram de mim com muito amor e iluminação, principalmente na trajetória do meu Mestrado e durante esse tempo longe das pessoas que mais amo na vida.

Aos meus pais, Eroneide e Regival, por todo o amor, apoio, paciência, compreensão e por todos os ensinamentos preciosos que os senhores me deram durante a minha criação e o meu crescimento profissional.

Aos meus irmãos, Lucas e Regival Júnior, e à minha cunhada, Danielle, pelo amor, carinho e alegrias partilhadas.

Aos meus sobrinhos, Miguel e Murilo, por serem as bênçãos e os maiores motivos de alegria da nossa família e por terem preenchido o meu coração com mais amor e com a melhor ansiedade que já senti na vida enquanto contava os dias para conhecê-los.

Ao meu companheiro, Fernandes Wilson, pela paciência, compreensão, amizade e apoio imensurável em todas as etapas e momentos mais importantes da minha vida. Por todo o sacrifício que tu aceitaste e fizeste para realizar meu sonho e sustentar nosso amor à distância, pois sem você ao meu lado, todas essas realizações não seriam possíveis.

À minha prima-irmã Lívia, aos meus tios e tias, aos demais primos e aos meus avós, Maria Socorro e Pedro Bezerra, pelo amor, cuidado e torcida constantes em minha vida.

À minha querida orientadora, Prof^a Hércia Stampini, pela excelente orientação, paciência, compreensão, incentivo diante das dificuldades, oportunidades, confiança e carinho durante nossa convivência.

À Natália Galdino, por todos os esforços que tu fizeste para que esse trabalho fosse possível, desde o delineamento até a escrita dos artigos, pela paciência, compreensão, dedicação, boa vontade em ajudar e pela amizade construída.

À Mariana Juste, pela parceria, confiança, compreensão, amizade e alegrias partilhadas durante nosso estudo experimental e nossa convivência no laboratório.

À Maria Eliza, pela orientação, parceria no desenvolvimento da nossa pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos, paciência, carinho e por todos os momentos de descontração e alegria no nosso convívio.

À Renata Celi, pela orientação, paciência, compreensão, ensinamentos, ajuda imensurável, conselhos, carinho e pela amizade construída.

Ao Prof. Frederico Barros, pela orientação, parceria e paciência durante os ensinamentos transmitidos.

À Dr^a Priscila Zaczuk, pela parceria e apoio fundamentais para o andamento da nossa pesquisa e desenvolvimento do meu Mestrado.

À Dr^a Elvira De Mejía e aos membros do Laboratório “Food Science and Human Nutrition in University of Illinois at Urbana-Champaign-USA”, pelo apoio e parceria relevantes para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

Ao Prof. Edy Brito, pela parceria e análises de identificação de compostos fenólicos nos materiais da presente pesquisa no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

Ao Prof. Ronoel Godoy, pela parceria e análises do perfil de aminoácidos nos materiais da presente pesquisa no Laboratório Multiusuário de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro.

À Prof^a Ana Vlândia e ao Ricardo, pela disponibilidade do Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS).

Ao Prof. Zé Humberto, Sílvia Torres, Angélica Gouveia e Carlos Mário, pela disponibilidade do Laboratório de Metabolismo e Fermentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB).

Ao Prof. Mafra, pela disponibilidade do Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Agentes Infecciosos e Parasitários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB).

À Prof^a Helena Sant'Ana e Pamella Cristine, pela disponibilidade do Laboratório de Análise de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS).

À Cris Cesário, pelos ensinamentos e disponibilidade do Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA).

À Christiane Mileib, pela disponibilidade e parceria nas análises estatísticas do artigo de análise dos feijões.

Ao Thomás Valente, pela amizade, conselhos e parceria nas análises estatísticas do artigo de análise dos feijões.

Às estagiárias Ana Lima, Jaqueline Vieira, Rafaela Bessa, Haira Guedes e Victória Huertas, pelo apoio e ajuda durante o desenvolvimento da presente pesquisa.

Às amigas do Laboratório de Nutrição Experimental, Bárbara Pereira, Bárbara Nery, Desirrê Morais, Julia Khéde, Luiza Dias, Mariana Granciere e Rita Stampini, pela amizade, boa vontade em contribuir com o próximo e alegrias durante nossa convivência.

Às amigas da Pós-Graduação, Adriane Moreira, Ana Paula, Dayane Morais, Fabiane Rezende, Gabriele Rocha, Laís Emilia, Laís Gusmão, Letícia De Nadai, Letícia Linhares, Mary Anne, Mariana de Santis, Naruna Rocha, Nayara Benedito, Olívia Coelho, Patrícia Moreira, Poliana Cristina, Priscila Vaz, Sarah Vieira e Thalita Lin, pelas amizades, conselhos e momentos de alegria partilhados.

Às amigas Andressa Monteiro, Fiama Caroliny, Talita Gomes e aos amigos Iago Reis e Gilberth Nunes, pelos cuidados e amizades constantes em minha vida.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

À Embrapa Arroz e Feijão, pelo apoio financeiro do projeto e à Bioclin/Quibasa, pelos kits bioquímicos doados à presente pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com o sucesso deste trabalho.

*“Só eu sei cada passo por mim dado,
nessa estrada esburacada que é a vida,
passei coisas que até mesmo Deus duvida,
fiquei triste, capionga, aperriada,
porém nunca me senti abandonada,
me agarrava sempre numa mão amiga
e de força minha alma era munida
pois do céu uma voz dizia assim:
- Suba o queixo, meta os pés, confie em mim
siga a luta que eu cuido das feridas”.*

Bráulio Bessa

BIOGRAFIA

SÂMARA LETÍCIA SILVA DE LIMA, filha de Regival Gomes de Lima e Eroneide Silva de Lima, nasceu em 29 de dezembro de 1991, em Bacabal, Maranhão. Em março de 2011, ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), graduando-se Nutricionista em fevereiro de 2015.

Em março de 2015, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, na linha de pesquisa Valor Nutricional, Funcional e Controle de Qualidade de Alimentos e Dietas, submetendo-se a defesa em fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | xiii |
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT..... | xvii |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 4 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 4 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 3.1 HIPERCOLESTEROLEMIA, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO..... | 5 |
| 3.2 FEIJÃO..... | 7 |
| 3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DO FEIJÃO | 9 |
| 3.4 PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO FEIJÃO..... | 12 |
| 3.5 EFEITO DO ARMAZENAMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO FEIJÃO..... | 14 |
| 4 METODOLOGIA GERAL..... | 20 |
| 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 20 |
| 4.1.1 <i>Delineamento experimental – Artigo 1</i> | 20 |
| 4.1.2 <i>Delineamento experimental – Artigo 2</i> | 21 |
| 4.2 MATÉRIA-PRIMA | 22 |
| 4.2.1 <i>Genótipos de feijão</i> | 22 |
| 4.2.2 <i>Cocção e processamento</i> | 24 |
| 4.2.3 <i>Hidrolisado proteico</i> | 24 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DE COMPOSTOS BIOATIVOS | 25 |
| 4.3.1 <i>Perfil e escore químico de aminoácidos (EQA)</i> | 25 |
| 4.3.2 <i>Análise da composição química</i> | 26 |
| 4.3.3 <i>Fibra alimentar</i> | 26 |
| 4.3.4 <i>Amido resistente</i> | 27 |
| 4.3.5 <i>Fenólicos totais</i> | 28 |
| 4.3.6 <i>Flavonoides totais</i> | 29 |
| 4.3.7 <i>Capacidade antioxidante</i> | 30 |
| 4.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS | 30 |
| 4.5 ENSAIO BIOLÓGICO..... | 31 |
| 4.5.1 <i>Animais e dietas experimentais</i> | 31 |
| 4.5.2 <i>Eutanásia</i> | 33 |
| 4.5.3 <i>Aspectos éticos</i> | 34 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.5.4 | <i>Medidas biométricas e de consumo alimentar</i> | 34 |
| 4.5.5 | <i>Análises bioquímicas</i> | 34 |
| 4.5.6 | <i>Obtenção do homogenato do fígado e quantificação de proteína</i> | 34 |
| 4.5.7 | <i>Capacidade antioxidante total do fígado e do soro</i> | 35 |
| 4.5.8 | <i>Análise dos níveis de peroxidação lipídica no fígado e no soro</i> | 36 |
| 4.5.9 | <i>Atividade enzimática da superóxido dismutase</i> | 37 |
| 4.5.10 | <i>Atividade enzimática da catalase</i> | 37 |
| 4.5.11 | <i>Avaliação da expressão gênica de proteínas ligadas ao estresse oxidativo e a inflamação no tecido hepático</i> | 38 |
| 4.5.12 | <i>Conteúdo de umidade e lipídios das fezes</i> | 40 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 40 |
| 5 | ARTIGO 1 | 41 |
| 5.1 | INTRODUÇÃO | 42 |
| 5.2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 5.3 | RESULTADOS | 47 |
| 5.4 | DISCUSSÃO | 56 |
| 5.5 | CONCLUSÃO | 61 |
| 6 | ARTIGO 2 | 62 |
| 6.1 | INTRODUÇÃO | 63 |
| 6.2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 65 |
| 6.3 | RESULTADOS | 72 |
| 6.4 | DISCUSSÃO | 82 |
| 6.5 | CONCLUSÃO | 89 |
| 7 | CONCLUSÃO GERAL | 90 |
| 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 91 |
| 9 | REFERÊNCIAS | 92 |
| 10 | APÊNDICES | 124 |
| | APÊNDICE 1 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS DA FARINHA CRUA E COZIDA DE FEIJÃO | 124 |
| | APÊNDICE 2 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS DO HIDROLISADO PROTEICO DE FEIJÃO | 124 |
| | APÊNDICE 3 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DA FARINHA CRUA DE FEIJÃO | 125 |
| | APÊNDICE 4 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA DO HOMOGENATO DO FÍGADO | 125 |
| | APÊNDICE 5 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO HOMOGENATO DO FÍGADO | 126 |
| | APÊNDICE 6 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO SORO | 126 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| | APÊNDICE 7 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO DO HOMOGENATO DO FÍGADO | 127 |
| | APÊNDICE 8 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO DO SORO | 127 |
| 11 | ANEXO | 128 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Delineamento experimental do artigo 1..... | 21 |
| Figura 2. Delineamento experimental do artigo 2..... | 22 |
| Figura 3. Genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero (linha superior) e armazenados por seis meses (linha inferior)..... | 49 |
| Figura 4. Interação cultivares de feijão*tempo para a composição química e conteúdo de compostos bioativos dos genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero e armazenados por seis meses. | 50 |
| Figura 5. Composição química dos genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero e armazenados por seis meses. | 53 |
| Figura 6. Conteúdos de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B) e atividade antioxidante (atividade de retirada de radical DPPH) (C) dos genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero e armazenados por seis meses. | 55 |
| Figura 7. Cromatogramas e estruturas químicas correspondentes aos fitoquímicos dos extratos da farinha integral de feijão cozido (A) e do hidrolisado proteico (B) do feijão BRSMG Madrepérola. | 73 |
| Figura 8. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na atividade das enzimas hepáticas (A), glicemia (B), perfil de lipídios (C), razões de lipídios CT/HDL e HDL/LDL (D) e no conteúdo de umidade e lipídios das fezes (E) dos camundongos após 9 semanas de experimentação. | 77 |
| Figura 9. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na capacidade antioxidante total (CAT) e na peroxidação lipídica (MDA) no fígado (A e C) e no soro (B e D) dos camundongos após 9 semanas de experimentação. | 78 |
| Figura 10. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na atividade e expressão gênica da superóxido dismutase (SOD) (A e C), na atividade da enzima catalase (B) e na expressão gênica da <i>heat shock protein 72</i> (HSP72) (D) no fígado dos camundongos após 9 semanas de experimentação..... | 80 |
| Figura 11. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na expressão de gênica de proteínas ligadas a inflamação no fígado dos camundongos após 9 semanas de experimentação: fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (A), interleucina 10 (IL 10) (B), fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B (NFkB) (C), receptores proliferadores peroxissomais alfa (PPAR α) (D)..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/Kg de dieta)..... | 33 |
| Tabela 2. Perfil de aminoácidos (g/100 g) de genótipos de feijão do tipo carioca após a colheita (tempo zero) à temperatura 21°C. | 48 |
| Tabela 3. Escore químico de aminoácidos (EQA), segundo a FAO/WHO (2007) de genótipos de feijão do tipo carioca após a colheita (tempo zero) à temperatura 21°C. | 49 |
| Tabela 4. Conteúdo de substâncias sequestrantes de radical (DPPH) equivalente a concentrações de ácido ascórbico (AA) e butilhidroxitolueno (BHT) nos extratos metanólicos dos genótipos de feijão do tipo carioca no tempo zero e armazenados por seis meses à temperatura 21°C..... | 55 |
| Tabela 5. Composição das dietas experimentais (g/Kg de dieta)..... | 68 |
| Tabela 6. Características espectrais de massa LC-UV-visible-MS de compostos fenólicos em extrato metanólico da farinha integral e do hidrolisado proteico de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. | 73 |
| Tabela 7. Medidas biométricas e de consumo alimentar dos camundongos..... | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| AA | Ácido ascórbico |
| AAR | Atividade de retirada de radical |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AOAC | <i>Association of Official Analytical Chemists</i> |
| AR | Amido resistente |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| WF | Farinha integral de feijão cozido |
| BHT | Butilhidroxitolueno |
| CAT | Capacidade antioxidante total |
| CEA | Coeficiente de eficiência alimentar |
| CEE | Coeficiente de eficiência energética |
| CN | CNFC 10467 |
| CONAB | Companhia Nacional de Abastecimento |
| CT | Colesterol total |
| DCV | Doenças cardiovasculares |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| DPP-IV | <i>Dipeptidyl peptide protease</i> |
| EAG | Equivalentes de ácido gálico |
| EC | Equivalentes de catequina |
| EQA | Escore químico de aminoácidos |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| ES | BRS Estilo |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| HFCD | Dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| PH | Hidrolisado proteico de feijão |
| HSP | <i>Heat Shock Proteins</i> |
| IHS | Índice hepatossomático |
| IL-10 | Interleucina 10 (IL-10) |
| IMC | Índice de massa corporal |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |

| | |
|---------------|---|
| LE | Lento escurecimento |
| MDA | Malondialdeído |
| MP | BRSMG Madrepérola |
| NFkB | Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B |
| PB | Pinto Bean |
| PO | BRS Pontal |
| PPAR α | Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa |
| RE | Rápido escurecimento |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TG | Triacilglicerídeos |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

RESUMO

LIMA, Sâmara Letícia Silva de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.): ação do armazenamento sobre a composição química e nutricional e efeito *in vivo* da farinha integral e de seu hidrolisado proteico no estresse oxidativo e na inflamação.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Maria Eliza de Castro Moreira, Frederico Augusto Ribeiro de Barros e Renata Celi Lopes Toledo.

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais consumidas e importantes no mundo. O mercado brasileiro é o maior produtor e consumidor de feijão dentre os países do Mercosul. No entanto, enfrenta dificuldades com a perda da qualidade dos grãos dessa leguminosa após a colheita e durante o armazenamento. Assim, novos cultivares de feijão carioca foram desenvolvidos com característica de resistência ao escurecimento durante o armazenamento. O consumo de feijão é associado à redução dos riscos de doenças cardiovasculares em virtude da sua qualidade nutricional. No processo de hidrólise das proteínas do feijão, ocorre a formação de peptídeos bioativos com atividade antioxidante e anti-inflamatória capazes de modular negativamente o estresse oxidativo e o processo inflamatório decorrente do consumo de dieta rica em gordura e colesterol. Os objetivos desse estudo foram determinar o efeito do armazenamento comercial (seis meses) sobre a composição química de genótipos de lento escurecimento (LE) e de rápido escurecimento (RE) e investigar o efeito do consumo da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão comum cozido sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório em camundongos BALB/c adultos alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica (HFCD). Para tal, análises foram realizadas nas farinhas de feijão cru obtidas após a colheita (tempo zero) e após o armazenamento por seis meses à temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, sem controle de umidade relativa do ar. Foram avaliados os genótipos Pinto Bean-PB (controle/LE), BRSMG Madrepérola-MP e CNFC 10467-CN (LE) e BRS Estilo-ES e BRS Pontal-PO (RE). O feijão que expressou o melhor perfil químico-nutricional (BRSMG Madrepérola-MP armazenado por seis meses) foi cozido e processado para sua utilização no ensaio biológico. A farinha integral de feijão cozido (WF) e o hidrolisado proteico de feijão (PH) foram analisados quanto ao conteúdo e perfil de compostos fenólicos. As medidas biométricas, de consumo alimentar e bioquímicas foram avaliadas em quatro grupos

experimentais (n= 12 por grupo): controle normal (AIN-93M), controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico (HFCD), HFCD adicionada de farinha integral de feijão cozido (HFCD-WF) e HFCD e PH (HFCD-PH), durante nove semanas de experimentação. Além disso, foram avaliadas a capacidade antioxidante total (CAT), atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD e catalase), peroxidação lipídica (malondialdeído – MDA), a expressão gênica de fator do necrose tumoral (TNF- α), interleucina 10 (IL-10), fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB), receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α), SOD e *Heat Shock Proteins 72* (HSP72) e a excreção de umidade e lipídios nas fezes. Observou-se que o escurecimento do tegumento dos genótipos RE após o armazenamento foi mais intenso quando comparado aos feijões de LE. O armazenamento por seis meses promoveu aumento (p<0,05) de 10,9% a 36,0% da concentração de amido resistente e redução (p<0,05) de 23,5% a 36,7% da capacidade antioxidante nos genótipos avaliados. As concentrações de fenólicos totais foram menores na WF (140,0 \pm 5,87 μ g EAG/g) e maiores no PH (1.025,6 \pm 99,14 μ g EAG/g), sendo identificados dois fenólicos (catequina e kaempferol) na WF e apenas o kaempferol no PH. O consumo de PH reduziu (p<0,05) o ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e o coeficiente de eficiência energética (CEE) nos animais, enquanto, a ingestão de WF reduziu (p<0,05) a atividade das enzimas hepáticas (ALT e AST) e aumentou (p<0,05) o conteúdo de umidade e lipídios nas fezes. As intervenções com WF e PH reduziram (p<0,05) a glicemia, o colesterol total, a peroxidação lipídica (MDA) no soro, aumentaram (p<0,05) a atividade de SOD e inibiram a ativação da via inflamatória do NFkB (p<0,05). Portanto, o conteúdo de amido resistente foi aumentado e a capacidade antioxidante foi reduzida nos feijões pelo armazenamento por seis meses, independente das características de resistência ou propensão dos genótipos ao escurecimento, e ambas as intervenções (WF e PH) são capazes de reduzir os riscos para as doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

LIMA, Sâmara Leticia Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): storage action on chemical and nutritional composition and *in vivo* effect of whole wheat flour and its protein hydrolyzate on oxidative stress and inflammation.** Advisor: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisors: Maria Eliza de Castro Moreira, Frederico Augusto Ribeiro de Barros and Renata Celi Lopes Toledo.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most consumed and important legumes in the world. The Brazilian market is the largest producer and consumer of beans among the Mercosul countries. However, it has difficulties with loss of grain quality after harvest and during storage. Thus, new cultivars of carioca beans were developed with characteristics of resistance to darkening during storage. Bean intake is associated with reduced risks of cardiovascular diseases due to their nutritional quality. The hydrolysis process of bean proteins, allows the formation of bioactive peptides with antioxidant and anti-inflammatory activity. These peptides are able to negatively modulate the oxidative stress and the inflammatory process caused by the consumption of diet rich in fat and cholesterol. The objective of this study was to evaluate the effect of commercial storage (six months) on the chemical composition of slow darkening (SD) and fast darkening (FD) genotypes and to investigate the effect of the consumption of whole flour and protein hydrolyzate from cooked common bean on oxidative stress and the inflammatory process in BALB/c mice fed with a hyperlipidemic and hypercholesterolemic diet (HFCD). For this, analyzes were performed on raw bean flours obtained after harvesting (time zero) and after storage for six months at room temperature of $21^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, without control of relative humidity. It were evaluated the genotypes Pinto Bean-PB (control/SD), BRSMG Madrepérola-MP and CNFC 10467-CN (SD) and BRS Style-ES and BRS Pontal-PO (FD). The bean who presented best chemical-nutritional profile (BRSMG Madrepérola-MP storage for six months) was cooked and processed for use in the biological assay. Whole cooked bean flour (WF) and the protein hydrolyzate of bean (PH) were analyzed for the content and profile of phenolic compounds. The biometric measures, food consumption and biochemical were evaluated in four experimental groups (n = 12 per group): normal control (AIN-93M), hyperlipidemic and hypercholesterolemic control (HFCD), HFCD

added with whole cooked bean flour (HFCD-WF) and HFCD and PH (HFCD-PH), for nine weeks of experimentation. In addition, were evaluated the total antioxidant capacity (TAC), the antioxidant enzyme activity (superoxide dismutase – SOD and catalase), lipid peroxidation (malondialdehyde – MDA), the gene expression of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 10 (IL-10), nuclear factor *kappa* B (NFkB), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α), SOD and *Heat Shock Proteins* (HSP72) and the excretion of moisture and fat in the feces. It was observed that the darkening of the integument of the FD genotypes after storage was more intense compared to SD beans. Six months of storage promoted an increase ($p < 0.05$) from 10.9% to 36.0% of the resistant starch concentration and a reduction ($p < 0.05$) from 23.5% to 36.7% of the antioxidant capacity of the genotypes. Total phenolic concentrations were lower in WF ($140.0 \pm 5.87 \mu\text{g GAE/g}$) and higher in PH ($1025.6 \pm 99.14 \mu\text{g GAE/g}$); being identified two phenolics (catechin and kaempferol) were identified in WF and only kaempferol was identified in PH. The PH consumption reduced ($p < 0.05$) the weight gain, food intake, food efficiency coefficient (FEC) and the energy efficiency coefficient (EC) of animals. Whereas the WF intake reduced ($p < 0.05$) the activity of liver enzymes (ALT and AST) and increased ($p < 0.05$) the content of moisture and lipid content in feces. Interventions with WF and PH reduced ($p < 0.05$) glycemia, total cholesterol, serum lipid peroxidation (MDA), increased ($p < 0.05$) SOD activity and inhibited the activation of the NFkB inflammatory pathway ($p < 0.05$). Therefore, resistant starch content was increased and the antioxidant capacity was reduced in beans by storage for storage six months, regardless of the resistance or propensity characteristics of the genotypes to the darkening, and both interventions (WF and PH) are able to reduce the risks for cardiovascular diseases.

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais importantes no mundo, seu consumo nos anos de 2013/2014 foi de aproximadamente 17,4 milhões de toneladas (BEEBE, 2012; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015; FAO, 2017a). O cultivo do feijoeiro responde pela segunda maior área colhida de leguminosas (32,1 milhões de hectares) e é difundido em quase todos os países de clima tropical e subtropical por sua capacidade de adaptação edafoclimática (BEEBE et al., 2014; FAO, 2017b).

O Brasil produz 3,33 milhões de toneladas anuais de feijão (safra 2015/2016) (CONAB, 2017). A classe comercial Carioca, feijão de tegumento de fundo claro (marrom claro/bege), é a mais cultivada (1,3 milhão de hectares) e responde por cerca de 2 milhões de toneladas da produção dessa leguminosa no país (CONAB, 2017; EMBRAPA, 2017). No entanto, esse tipo de feijão tem por desvantagem o rápido escurecimento (RE) dos grãos após a colheita (FARIA et al., 2004; BRAGANTINI, 2005). Essa característica associada a condições de temperatura e umidade elevadas (>25°C e >65% UR) praticadas pela cadeia produtiva e durante o armazenamento comercial (seis meses) tornam esse produto mais suscetível aos fenômenos de escurecimento e endurecimento dos grãos, resultando na perda de qualidade dos feijões tipo carioca, pois consumidores e processadores associam o tegumento escuro ao envelhecimento e resistência dos grãos ao cozimento (VIEIRA; YOKOYAMA, 2000; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005; COELHO et al., 2009; NASAR-ABBAS et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2014).

Os fenômenos de escurecimento e defeitos texturais *hardshell* (casca dura) e *hard-to-cook* (difícil-de-cozinhar) são resultado de modificações na fisiologia e na composição química dos grãos, pois durante o armazenamento em condições inadequadas há aumento da atividade de enzimas oxido-redutases, gelatinização do amido, desnaturação de proteínas, oxidação dos lipídios, redução da solubilidade da pectina e oxidação ou lignificação dos compostos fenólicos com proteínas de reticulação dos grãos (STANLEY; AGUILERA, 1985; LIU; BOURNE, 1995; REYES-MORENO; PAREDES-LÓPEZ; GONZALEZ, 1993; MARLES; VANDENBERG; BETT, 2008; SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011; NJOROGÉ et al., 2015, 2016). Portanto, características de rápido escurecimento nos feijões tipo carioca influenciam

negativamente na qualidade e na aceitação comercial, sensorial e nutricional dos grãos (BASSINELLO et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2016ab). Diante desses problemas, os genótipos de feijão carioca BRSMG Madrepérola, IAC Milênio, IAC Alvorada, BRS Requite e ANFC9 foram desenvolvidos em pesquisas de melhoramento genético da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) com características de lento escurecimento (LE) durante o armazenamento (FARIA et al., 2004; CARNEIRO et al., 2012; CONAB, 2015).

O armazenamento comercial (seis meses) do BRSMG Madrepérola sob condições de temperatura e umidade controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}/<65\% \text{ UR}$) não afetou a concentração e o grau de hidrólise das proteínas e a capacidade antioxidante desse genótipo de LE (ALVES et al., 2016a). Esse estudo comprovou ainda que essas condições de armazenamento não afetaram as propriedades biológicas do produto derivado desse feijão, pois o ensaio em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células semelhantes a macrófagos humanos (macrófagos THP-1), demonstrou que o hidrolisado proteico do Madrepérola atuou inibindo o processo inflamatório por meio da redução dos marcadores fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina 1- β (IL-1- β) (ALVES et al., 2016a). Em outro ensaio *in vitro* (macrófagos THP-1) em modelo de aterosclerose induzida por lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) realizado por Alves e colaboradores (2016b), o armazenamento por seis meses também sob condições controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}/<65\% \text{ UR}$) não afetou as propriedades antiateroscleróticas dos peptídeos do isolado proteico do feijão Madrepérola. Os peptídeos desse feijão tipo carioca inibiram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), reduziram os marcadores inflamatórios ($\text{TNF-}\alpha$ e PGE2) e a expressão do receptor de LDLox semelhante à lectina 1 (LOX-1), da metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9), da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e das citocinas relacionadas ao processo aterosclerótico (ALVES et al., 2016b).

Os efeitos anti-inflamatórios, antiaterosclerótico, antioxidante, antidiabético, anti-hipertensivo e anticarcinogênico dos hidrolisados proteicos e dos peptídeos bioativos do feijão carioca são propriedades funcionais de interesse para a realização de investigações *in vivo* (LUNA-VITAL et al., 2015; MOJICA; CHEN; MEJÍA, 2015; ALVES et al., 2016ab). Nesse sentido, o consumo de feijão e de seus derivados

(hidrolisado proteico e peptídeos bioativos) consiste em uma estratégia dietética interessante para modular a hipercolesterolemia e reduzir os riscos para as doenças cardiovasculares (DCV), maior causa de morbimortalidade a nível mundial (LAMMI et al., 2015; NELSON, 2013; WHO, 2017).

A hipercolesterolemia é caracterizada pelo desequilíbrio da homeostase de lipídios e elevação de lipoproteínas no plasma, mais comumente, colesterol total, LDL-colesterol e triacilglicerídeos, e está associada principalmente à composição da dieta e a inatividade física (STONE et al., 2013). A exposição prolongada a hipercolesterolemia resulta em alterações na estrutura e função dos vasos sanguíneos (GRANGER et al., 2010), no acúmulo de lipídios no tecido hepático (WESTERBACKA et al., 2005; ANDRADE et al., 2013; NAIR et al., 2014) e no aumento da peroxidação lipídica e da produção de EROs (KURTEL et al., 2013). O estresse oxidativo induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , ativa a via inflamatória do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB) (CAI et al., 2005; SU et al., 2015) e essa sinalização produz mais EROs e citocinas inflamatórias, aumentando continuamente o estresse oxidativo e o dano celular (SCHETT et al., 2013).

Embora novos cultivares tenham sido desenvolvidos, não foram encontrados relatos na literatura do efeito do armazenamento comercial por seis meses em condições de temperatura controlada sobre as características químicas e de compostos bioativos nos feijões de LE e RE. Portanto, acredita-se que a determinação do perfil químico-nutricional dos novos cultivares e de linhagens de feijões tipo carioca após a colheita e após seis meses de armazenamento, demonstrará os efeitos do armazenamento e a qualidade tecnológica, sob o aspecto nutricional, em feijões com comportamento de resistência e suscetibilidade ao escurecimento.

Estudos *in vitro* têm demonstrado importantes características e atividades fisiológicas dos hidrolisados proteicos e dos peptídeos bioativos do feijão. No entanto, são escassos estudos *in vivo* que comprovem a bioatividade desses derivados das proteínas dos feijões. Portanto, a hipótese da presente pesquisa é que a ingestão da farinha e do hidrolisado proteico de feijão fornecerá peptídeos com função antioxidante capazes de modular negativamente o estresse oxidativo e a inflamação induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica em modelo experimental com camundongos BALB/c.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ação do armazenamento sobre a composição química e nutricional de genótipos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), tipo comercial carioca e *Pinto Bean*, e o efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão cozido na modulação do estresse oxidativo e da inflamação em camundongos BALB/c alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do armazenamento por seis meses à temperatura de 21°C na composição centesimal, conteúdos de fibra insolúvel e solúvel, amido resistente, conteúdo de fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidante de genótipos de feijões crus;
- Avaliar o efeito da farinha integral armazenada por seis meses e do hidrolisado proteico de feijão comum cozido sobre as medidas biométricas, o consumo alimentar, o perfil bioquímico, a umidade e o conteúdo de lipídios das fezes de camundongos BALB/c alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica;
- Avaliar o efeito da farinha integral armazenada por seis meses e do hidrolisado proteico de feijão comum cozido sobre a capacidade antioxidante e o estresse oxidativo no soro e fígado dos camundongos;
- Avaliar o efeito da farinha integral armazenada por seis meses e do hidrolisado proteico de feijão comum cozido sobre a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e ao processo inflamatório.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Hipercolesterolemia, estresse oxidativo e inflamação

A hipercolesterolemia, dentre as dislipidemias, é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (NELSON, 2013; LAMMI et al., 2015) e representa uma das principais causas de morbimortalidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (WHO, 2017). Essa condição é caracterizada pelo desequilíbrio da homeostase de lipídios e elevação de lipoproteínas no plasma, mais comumente, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e triacilglicerídeos e está associada principalmente à composição da dieta e inatividade física (STONE et al., 2013).

Em decorrência das maiores concentrações de LDL no lúmen vascular e da oxidação dessa lipoproteína, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumenta o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e os biomarcadores da inflamação, contribuindo para a progressão da aterosclerose (CRISTOFORI et al., 2004; CAM; DE MEJIA, 2012; HEIN et al., 2009).

O estresse oxidativo na célula ocorre quando a produção dos radicais livres é superior aos limites que o organismo pode utilizar e convertê-los, pelos mecanismos antioxidantes (enzimas, proteínas de choque térmico induzíveis - HSPs e os fitoquímicos da dieta), a produtos mais estáveis, resultando em danos celulares e teciduais (OYENIHI et al., 2015). O aumento dos níveis dessas espécies reativas nos tecidos é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, entre elas, a aterosclerose (PIRAYESH; MEHRALI, 2015).

A peroxidação de lipídios é um dos danos causados pelas EROs no organismo, seu mecanismo de produção consiste na reação em cadeia iniciada pelo radical hidroxil sobre os ácidos graxos da membrana fosfolipídica, resultando na formação de hidroperóxidos de lipídios e de produtos como o malondialdeído (MDA), responsáveis por alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; AJILA et al, 2007).

O estresse oxidativo está associado com concentrações elevadas de MDA, pois esse possui ação citotóxica e genotóxica (ANDRADE et al., 2005). A investigação do conteúdo desse produto nos sistemas biológicos é uma variável importante para avaliação do índice de peroxidação lipídica, uma vez que o MDA é um biomarcador de estresse oxidativo celular (SÁNCHEZ; CALPENA; CLARES, 2015). Visando a

redução de EROs, o primeiro mecanismo de defesa antioxidante do organismo é o enzimático, constituído pela superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (Cat) e outras redutases (RIBEIRO et al., 2005).

As superóxidos dismutases (SOD) são enzimas constituídas por diferentes grupos proteicos, com a função de converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. No sistema eucariótico, duas formas de SOD foram identificadas: a forma encontrada no citosol, Cu/Zn-SOD, constituída pelo íon cobre (Cu) no seu sítio ativo e o íon zinco (Zn), que tem como função estabilizar a molécula; a outra forma é localizada na mitocôndria, a Mn-SOD, sendo o íon manganês encontrado no seu sítio ativo e responsável pela reação de dismutação (NETO et al., 2008). A forma enzimática da SOD Cu/Zn-SOD é considerada como constitutiva, enquanto que a Mn-SOD é indutível (WHITE, 1993).

A catalase (hidroperoxidase), responsável pela dismutação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), é uma enzima intracelular, encontrada nos peroxissomas de animais e plantas e também no citoplasma de procariontes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Outra enzima responsável pela redução do peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos orgânicos é a glutathiona peroxidase (GSH-Px), localizada no citosol e na matriz mitocondrial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Outro sistema de defesa contra os danos oxidativos é formado pela indução da síntese de proteínas de estresse, HSP 70 (*Heat Shock Proteins*). Estas, atuam reprimindo interações inadequadas de proteínas, auxiliando na síntese, estruturação final e translocação intracelular de proteínas re-sintetizadas (MAYER; BUKAY, 2005; RODRIGUEZ et al., 2006). Adicionalmente, a HSP72 apresenta efeitos anti-inflamatórios por inibir as vias de sinalização intracelular, proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF-κB), diminuindo a transcrição de marcadores inflamatórios como a interleucina-1 beta (IL-1β), a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (SINGLETON; BECKEY; WISCHMEYER, 2005; TAWFIK et al., 2012). Além disso, a expressão gênica prolongada da HSP72 potencializa o efeito protetor da SOD (BARNES; KARIN, 1997; TOGNI, 2007).

O NF-κB encontra-se ligado a proteína inibidora IκB (proteína regulatória que inibe o NF-κB) no citosol. Sua ativação ocorre mediante a presença de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α, que fosforila a IκB, permitindo a sua degradação pelo

proteassomo. Este processo permite a liberação do NF-κB (p65) que, por sua vez, transloca-se para o núcleo e se liga a sequências que ativam a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória (BARNES; KARIN, 1997).

3.2 Feijão

O feijão comum, espécie *Phaseolus vulgaris* L., membro da família Leguminosae, gênero *Phaseolus*, é uma das leguminosas mais importantes no mundo em função da sua elevada aceitabilidade entre as culturas, principalmente entre a população de baixa renda de países em desenvolvimento, e por ser uma excelente fonte de proteínas, carboidratos complexos (amido, fibra alimentar e amido resistente), vitaminas, minerais, compostos fenólicos, entre outros fitoquímicos (THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003; SANTOS; GAVILANES, 2006; BEEBE, 2012; HAYAT et al., 2014; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015). O cultivo e domesticação do feijoeiro se iniciou na América e atualmente é difundido em quase todos os países de clima tropical e subtropical por sua capacidade de adaptação edafoclimática (BEEBE et al., 2014; HAYAT et al., 2014). O plantio de feijão responde pela segunda maior área colhida de leguminosas (32,1 milhões de hectares) e seu consumo mundial e no Brasil (safra 2015/2016) é de aproximadamente 17,4 milhões de toneladas e 2 milhões de toneladas, respectivamente (BEEBE et al., 2014; CONAB, 2017; FAO, 2017ab).

O Brasil surge como um dos maiores produtores e consumidores de feijão do mundo no panorama internacional de 2009/2013 (CONAB, 2015). Dentre os países do Mercosul, o país destaca-se por apresentar participação superior a 90% na produção e consumo dessa leguminosa, em média 182,9 g/dia de feijão cozido (POF, 2010; CONAB, 2015). As Projeções do Agronegócio - Brasil 2014/2015 a 2024/2025 indicam que haverá necessidade de importação de feijão nos próximos anos (BRASIL, 2015b). Esses resultados, segundo os técnicos da Embrapa Arroz e Feijão, refletem o aumento do consumo aparente per capita do feijão, a busca por alimentos saudáveis e a valorização dessa leguminosa por parte da população (BRASIL, 2015b). Segundo os últimos levantamentos, a produtividade do feijão aumentou 19,2% em função de condições climáticas favoráveis e do aumento de 5,5% da área plantada dessa leguminosa (CONAB, 2017).

O consumo de feijão está associado com muitos benefícios fisiológicos e com a prevenção de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes mellitus, câncer, síndrome

metabólica, estresse oxidativo e inflamação (CÂMARA; URREA; SCHLEGEL, 2013; HAYAT et al., 2014). A propriedade hipolipemiante do feijão é o principal efeito do consumo dessa leguminosa e está relacionada com a presença de fitoquímicos (compostos fenólicos, polissacarídeos não digeríveis, inibidores enzimáticos com baixo índice glicêmico, peptídeos bioativos, saponinas e fitoesteróis) na sua matriz alimentar (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015). A redução de lipídios séricos, redução da ingestão alimentar e a inibição da absorção de lipídios intestinais são os mecanismos fisiológicos mais importantes da regulação de lipídios pelos fitoquímicos do feijão (HAN et al., 2003, 2004; FANTINI et al., 2009; CHÁVEZ-SANTOSCOY; GUITÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2013; NILSSON et al., 2013; SPADAFRANCA et al., 2013; CHÁVEZ-SANTOSCOY et al., 2014).

As fibras alimentares, o amido resistente, os fitosteróis e as saponinas do feijão reduzem a hipercolesterolemia porque inibem a absorção de lipídios intestinais, formam complexos com ácidos biliares, aumentam a excreção de colesterol fecal e sobrerregulam o receptor que regula o colesterol e os ácidos graxos livres (receptor LXR) no fígado (RIGOTTI et al., 1989; OSTLUND, 2004; KAHLON; SMITH; SHAO, 2005; CHÁVEZ-SANTOSCOY; GUITÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2013; CHÁVEZ-SANTOSCOY et al., 2014). Outro mecanismo hipocolesterolêmico já elucidado, é a ativação dos receptores de hormônios intestinais e neuropeptídeos orexígenos (grelina) e neuropeptídeos anorexígenos (peptídeo-1 tipo glucagon, peptídeo tirosina-tirosina e colecistoquinina) moduladores do apetite e da saciedade pelos ácidos graxos de cadeia curta, produzidos pela fermentação das fibras e do amido resistente, e pela fitohemaglutinina (TOPPING; CLIFTON, 2001; BAINTENER et al., 2003; TAPSELL, 2004; BLOEMEN et al., 2009; DARZI; FROST; ROBERTSON, 2011).

As proteínas do feijão também modulam a hipercolesterolemia por meio da redução da absorção de colesterol, pois alguns dos peptídeos bioativos (sequências curtas de aminoácidos) dessa leguminosa interagem hidrofobicamente com o colesterol e inibem a formação das micelas no intestino (HAYAT et al., 2014; LUNA-VITAL et al., 2015; MARQUES et al., 2015ab). Existem ainda evidências de que a inibição das lipases pancreática e hepática e da lipoproteína lipase pelos compostos fenólicos (ácido fítico, catequinas e proantocianidinas) reduz a absorção de lipídios intestinais e a produção de *low density lipoprotein* (LDL) e regula fatores de transcrição lipogênicos.

No entanto, essa via ainda precisa ser comprovada e elucidada com estudos em modelo animal e ensaios clínicos (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015).

3.3 Composição química e nutricional do feijão

O feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cru, sem e com armazenamento (360 dias a 25°C/75% \pm 5% UR), apresenta composição química (base úmida) de, respectivamente, 14,0% e 13,6% de umidade, 3,5% e 4,4% de cinzas, 20,0% e 21,4% de proteína, 1,3% e 1,3% de lipídios, 61,2% e 52,0% de carboidratos, dos quais 18,4% e 7,0% são de fibra alimentar total, e 339 kcal e 305,3 kcal/100 g de valor energético (TACO, 2011; VANIER et al., 2014). Enquanto que o feijão cozido, sem armazenamento, possui perfil nutricional (base úmida) de 80,4% de umidade, 0,7% de cinzas, 4,8% de proteína, 0,5% de lipídios, 13,6% de carboidratos, dos quais 8,5% são de fibra alimentar total, e 76 kcal/100 g de valor energético (TACO, 2011).

Os carboidratos são os componentes de maior conteúdo no feijão, sendo os polissacarídeos de amido e não amido, e os oligossacarídeos os principais componentes encontrados nessa leguminosa (OLIVEIRA et al., 2001; HAYAT et al., 2014). Os dois principais polímeros que formam o amido no feijão são a amilose e amilopectina (THARANATHAN, 2002; ZHOU et al., 2004). O amido é classificado com base na sua estrutura e de acordo com a velocidade de digestão *in vitro* do alimento, em amido rapidamente digerível, amido lentamente digerível e amido resistente (AR) (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992). O AR é definido como a soma de amido e de produtos de sua degradação não digeridos no intestino delgado de seres humanos e é classificado em quatro tipos: tipo I, amido fisicamente inacessível envolvido por matriz proteica e pela parede celular; tipo II, amido granular com o polimorfismo de tipo B ou C; tipo III, amido retrogradado formado durante o processamento hidrotérmico e subsequente resfriamento dos alimentos; tipo IV, amido quimicamente modificado ou complexado com proteínas ou polissacarídeos; e tipo V, amido formado pelo complexo amilose-lipídios (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; LESZCZYŃSKI, 2004; BIRT et al., 2013; NUNES et al., 2016). Os feijões cru e cozido, com e sem armazenamento, são fonte significativa de AR dos tipos I, IV e V (COSTA et al., 2006; PUJOLÀ; FARRERAS; CASAÑAS, 2007; EYARU; SHRESTHA; ARCOT, 2009; PEDROSA et al., 2015).

As concentrações de AR (base seca) em feijões crus após a colheita variam de 22,9 a 36,0 g/100 g e em feijões cozidos são de 3,3 a 8,5 g/100 g (RAMÍREZ-

JIMÉNEZ et al., 2015). O tratamento térmico reduz significativamente o conteúdo de AR do feijão e de outras leguminosas (ervilha, fava, grão-de-bico e lentilha) em comparação com as amostras cruas após a colheita (COSTA et al., 2006; PUJOLÀ; FARRERAS; CASAÑAS, 2007; EYARU; SHRESTHA; ARCOT, 2009; PEDROSA et al., 2015). A redução do AR é atribuída ao aumento das frações de amido durante o tratamento hidrotermal, pois nesse processo ocorre o inchaço, solubilização e a gelatinização das moléculas de amido, tornando o AR mais propenso à hidrólise enzimática (SIDDHURAJU; BECKER, 2001; PUJOLÀ; FARRERAS; CASAÑAS, 2007; EYARU; SHRESTHA; ARCOT, 2009). O armazenamento, por sua vez, induz a formação do AR em feijões crus (AR tipo IV e V) e cozidos (AR tipo III), pois durante o envelhecimento do feijão há formação de complexos amilose-lipídios, interações dentre amido e proteína, gelatinização e retrogradação do amido, alterações que tornam as moléculas de amido menos suscetível a atividade enzimática (GURAYA; KADAN; CHAMPAGNE, 1997; MANGALA; UDAYASANKAR; THARANATHAN, 1999; OSORIO-DÍAZ et al., 2003; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; NUNES et al., 2016).

O conteúdo de fibra alimentar (base úmida) no feijão cozido são estimados em 9,6% de celulose, 0,5% de hemicelulose, 1,7% de lignina, 0,8% de pectina, 5,8% de protopectina, menos de 0,5% de substâncias fenólicas, 0,3 a 14,1 mg de rafinose, 2,7 a 63,0 mg de estaquiose e 0,1 a 38,5 mg de verbascose (MENDEZ et al., 1995; DÍAZ-BATALLA et al., 2006; RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008; CAMPOS-VEGA et al., 2010; MARTINO et al., 2012). O feijão carioca cru após a colheita apresenta concentrações de fibra alimentar total e frações solúvel e insolúvel de em média, respectivamente, 23,3 g, 4,1 g e 19,1 g/100 g (base seca) (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008; SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2009; BARROS; PRUDENCIO, 2016). No entanto, o armazenamento por oito meses (30°C/75% de UR), reduz significativamente os conteúdos de fibra total e frações solúvel e insolúvel no feijão cru para, respectivamente, 17,6 g, 1,4 g e 16,2 g/100 g (base seca) (SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2009).

O conteúdo de lipídios no feijão é muito baixo e em alguns cultivares, os ácidos graxos insaturados representam 65 a 87% dos lipídios totais, sendo as frações ácidos α -linolênico (37 a 54%), ácido linoléico (21 a 28%) e ácido oléico (7 a 10%) predominantes (CHIARADIA; GOMES, 1997; MARTINO et al., 2012). O

armazenamento por oito e 12 meses, em temperaturas distintas (30°C e 25°C), não reduziu significativamente o conteúdo de lipídios no feijão carioca em relação às amostras analisadas após a colheita (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008; SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2009; VANIER et al., 2014; BARROS; PRUDENCIO, 2016). No entanto, para que ocorra a manutenção das concentrações de ácidos graxos é recomendado que o armazenamento de leguminosas ocorra em temperaturas mais baixas (10°C e 20°C) (SRAVANTHI et al., 2013).

Além de ser uma fonte apreciável de macronutrientes essenciais ao organismo, o feijão contém vitaminas hidrossolúveis, com destaque para os conteúdos de tiamina (0,8 a 1,32 mg/100g), riboflavina (0,112 a 0,411mg/100g), niacina (0,85 a 3,21 mg/100g), piridoxina (0,299 a 0,659 mg/100g) e ácido fólico (0,148 a 0,676 mg/100g) (HAYAT et al., 2014). O conteúdo de folato nessa leguminosa (400 a 600 µg) satisfaz 95% da necessidade diária dessa vitamina (KADAM; SALUNKHE, 1989). Os feijões também apresentam em sua matriz alimentar γ -tocoferóis, δ -tocoferóis e α e β -tocoferóis (BAUERFEIND, 1980).

Adicionalmente, esses grãos são uma excelente fonte de minerais, apresentando concentrações consideráveis de ferro (62,0 a 150,0 µg/g), cálcio (60,0 a 174,2 mg/100g), cobre (10,1 a 109 µg/g), zinco (2,8 a 10,9 µg/g), potássio (1.200 a 1.513 mg/100g), fósforo (15,8 a 64,6 µg/g), alumínio (6,7 a 14,4 µg/g) e magnésio (190,0 a 216,0 mg/100g) (MARTINO et al., 2012; HAYAT et al., 2014). O armazenamento por seis meses em condições ambientais (25°C, sem controle de umidade) não reduziu o conteúdo mineral de genótipos de feijão carioca crus (BRS Estilo, BRSMG Madrepérola e BRS Pontal) (SILOCHI et al., 2016). Nesse estudo observou-se que o armazenamento aumentou os conteúdos (base seca) de ferro de 8,74 mg para 12,0 mg, de zinco de 4,04 mg para 4,64 mg e de fósforo de 0,25 mg para 0,32 mg/100 g nos feijões (SILOCHI et al., 2016).

O feijão apresenta variado conteúdo de compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, flavonoides, proantocianidinas, flavonóis, ácidos fenólicos, taninos, glicosídeos e isoflavonas (HAYAT et al., 2014). O perfil e a concentração de fenólicos do feijão carioca cru sem armazenamento inclui os ácidos: gálico (1,26 µg.g⁻¹), protocatecuico (16,36 µg.g⁻¹), clorogêncio (8,59 µg.g⁻¹), 4-hidroxibenzoico (12,01 µg.g⁻¹), cafeico (8,78 µg.g⁻¹), vanilina (1,47 µg.g⁻¹), p-cumárico (3,60 µg.g⁻¹) e ferúlico (24,03 µg.g⁻¹) (TELLES; KUPSKI; FURLONG, 2017). Os genótipos de feijão carioca

BRS Horizonte, BRS Pontal e Pérola, apresentam concentrações de fenólicos totais de 5,46 a 15,5 mg EAG/g, de antocianinas de 0,01 mg/g a 13,0 mg/g, de flavonoides de 0,083 a 0,694 mg ER/g, e de taninos de 60,6 a 369,3 mg EC/g de amostra (MOJICA et al., 2015). Esses compostos são responsáveis pela atividade antioxidante dos feijões, pois atuam inativando os radicais livres ou as enzimas envolvidas na sua produção, como a lipoxigenase e a xantina oxidase, formando complexo com íons metálicos e inibindo agentes mutagênicos, como as aflatoxinas (HAYAT et al., 2014). O armazenamento por seis meses (25°C, sem controle de umidade) aumentou as concentrações (base seca) de taninos de 280,0 mg para 341,6 mg/100 g e de ácido fítico de 0,11 µg para 0,14 µg/100 g em genótipos de feijão carioca crus (BRS Estilo, BRSMG Madrepérola e BRS Pontal) (SILOCHI et al., 2016).

3.4 Proteínas e peptídeos bioativos do feijão

O feijão é uma excelente fonte de proteínas vegetais e em combinação com outros alimentos, como o trigo e outros cereais, fornece aminoácidos essenciais para a nutrição humana (BUTT; BATOOL, 2010). Batista e colaboradores (2011) enfatizam que o uso de grãos ricos em proteínas combinado com cereais, consiste em uma estratégia de combate à desnutrição proteica muito aplicada na América Latina, África Oriental e na Ásia (BROUGHTON et al., 2003; SIDDIQ et al., 2010).

As proteínas dos grãos podem ser classificadas com base na sua função como: proteína de armazenamento, metabolismo de carboidratos, defesa, resposta ao estresse, desintoxicação, crescimento e desenvolvimento, proteína transporte e metabolismo do nitrogênio (DE LA FUENTE et al., 2012). As principais proteínas do feijão são globulinas (54 a 79%), albuminas (12 a 30%) e glutelina (20 a 30%), que são relacionadas com o metabolismo do feijoeiro (SEENA; SRIDHAR; BAJIA, 2005; SLUPSKI, 2010). A faseolina (globulina) é uma glicoproteína constituída por açúcares neutros, como a manose, e por polipeptídeos formados por 3 subunidades (α , β e γ), que representa cerca de metade do conteúdo de proteína total do feijão (30-50%) (TANG et al., 2009; YIN et al., 2011; MARTINO et al., 2012; LUNA-VITAL et al., 2015).

Os peptídeos bioativos são sequências curtas de aminoácidos, aproximadamente 2 a 20 unidades, derivados das proteínas dos alimentos (LUNA-VITAL et al., 2015). O processo de hidrólise ou fermentação das proteínas liberam os peptídeos bioativos, os quais podem desempenhar efeitos fisiológicos benéficos no organismo (BERNARDINI et al., 2011). Os mecanismos e processos envolvidos na obtenção de peptídeos do feijão

variam na literatura, entretanto as proteases, tais como pepsina, pancreatina, quimiotripsina, tripsina, termolisina são as mais utilizadas no processo de hidrólise das proteínas do feijão (LUNA-VITAL et al., 2015).

Estudos com modelo animal consumindo dieta hipercolesterolêmica, têm observado que as proteínas de leguminosas e os seus hidrolisados atuam melhorando o perfil de lipídios por meio da redução de colesterol total, LDL e triacilglicerídeos e aumento da excreção fecal de lipídios e de ácidos biliares (SIRTORI et al., 2004; FROTA et al., 2008; FONTANARI et al., 2012). Zhong e colaboradores (2007a) identificaram peptídeo hipocolesterolemiante derivado do hidrolisado proteico de soja (SAPH) e comprovaram os seus efeitos em modelos *in vitro* e *in vivo* (ZHONG et al., 2007b). O peptídeo WGAPSL, formado pela sequência de aminoácidos Try-Gly-Ala-Pro-Ser-Leu, inibiu a solubilidade micelar do colesterol por mecanismo de hidrofobicidade em ensaio *in vitro* (ZHONG et al., 2007a). Diante dessa evidência, Zhong e colaboradores (2007b) realizaram ensaio biológico com camundongos consumindo dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica (10% de gordura de porco e 1% de colesterol) e hidrolisado de soja (SAPH) nas concentrações de 0,1 a 2,5 g/Kg de peso de animal. Os autores observaram que o hidrolisado de soja foi eficaz em reduzir de 34 a 45 % as frações LDL e VLDL após 30 dias de intervenção (ZHONG et al., 2007b).

Os peptídeos derivados de cultivares melhorados de feijão comum do México e do Brasil têm sido identificados e caracterizados com importantes propriedades bioativas (OSEGUERA-TOLEDO et al., 2011; MOJICA; CHEN; MEJÍA, 2015; LUNA-VITAL et al., 2015; ALVES et al. 2016a; ALVES et al., 2016b). Mojica e Mejía (2015) e Alves e colaboradores (2016ab) ao caracterizarem o perfil de peptídeos bioativos de hidrolisados de feijão, encontraram predominantemente sequências com bioatividade anti-hipertensiva (Ser-Gly-Ala-Met, Asp-Ser-Ser-Gly, Glu-Pro-Thr-Glu e Lys-Pro-Lys-Leu), antioxidante (Leu-Leu-Ala-His e Lys-Pro-Lys-Leu), antidiabética e de inibição da *dipeptidyl peptide protease IV* (DPP-IV) (Leu-Leu-Ala-His e Tyr-Val-Ala-Thr).

A propriedade antioxidante dos peptídeos tem sido associada à presença de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina), básicos (histidina, arginina) e hidrofóbicos (valina, leucina, isoleucina ou alanina) na sequência dos hidrolisados, pois os grupos fenólicos presentes nesses resíduos agem como doadores de prótons para radicais deficientes, mantendo a estabilidade dessa molécula (GUO; KOUZUMA;

YONEKURA, 2009; SARMADI; ISMAIL, 2010). Além disso, os peptídeos podem ter ação sinérgica com antioxidantes não peptídeos, como os flavonoides presentes no feijão, potencializando o seu efeito bioativo (KITTS; WEILER, 2003; LUNA-VITAL et al., 2015). Nesse sentido, os peptídeos bioativos antioxidantes representam alternativas seguras para a conservação de alimentos e, por sua vez, para desempenhar atividades biológicas benéficas à saúde, reduzindo a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (MEISEL, 2004).

Com objetivo de investigar outros efeitos dos peptídeos bioativos do hidrolisado proteico de feijão cozido BRSMG Madrepérola, com e sem armazenamento por seis meses, Alves e colaboradores (2016a) realizaram ensaio em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos humanos (macrófagos THP-1). Os autores observaram que além da atividade antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva e de inibição da enzima DPP-IV, as sequências de peptídeos do hidrolisado do feijão Madrepérola apresentaram atividade anti-inflamatória, pois foram eficazes em reduzir os marcadores inflamatórios fator de necrose tumoral (TNF- α), prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina 1- β (IL-1- β). Em outro ensaio *in vitro* (macrófagos THP-1) em modelo de aterosclerose induzida por lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (ALVES et al., 2016b), observou-se que os peptídeos do isolado proteico de feijão Madrepérola apresentaram propriedades antiateroscleróticas, pois inibiram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), reduziram os marcadores inflamatórios (TNF- α e PGE2) e a expressão do receptor de LDLox semelhante à lectina 1 (LOX-1), da metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9), da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e das citocinas relacionadas ao processo aterosclerótico (ALVES et al., 2016b).

3.5 Efeito do armazenamento sobre as características do feijão

A classe comercial Carioca, feijão de tegumento de fundo claro (marrom claro/bege), é a mais cultivada (1,3 milhão de hectares) no Brasil e, responde por 1,1 milhão de toneladas do consumo dessa leguminosa no país (CONAB, 2017; EMBRAPA, 2017). No entanto, esse tipo de feijão tem por desvantagem o rápido escurecimento (RE) dos grãos após a colheita (FARIA et al., 2004; BRAGANTINI, 2005). Essa característica associada a condições de temperatura e umidade elevadas (>25°C e >65% UR) e de exposição à luz, praticadas pela cadeia produtiva e durante o armazenamento comercial (seis meses), tornam esse produto mais suscetível aos

fenômenos de escurecimento e endurecimento dos grãos, resultando na perda de qualidade dos feijões tipo carioca, pois consumidores e processadores associam o tegumento escuro ao envelhecimento e resistência dos grãos ao cozimento (VIEIRA; YOKOYAMA, 2000; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005; COELHO et al., 2009; NASAR-ABBAS et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2014).

A temperatura e a umidade são os principais fatores que determinam a manutenção da qualidade fisiológica dos grãos de feijão armazenados (POPINIGIS, 1977). A temperatura é o fator físico mais importante durante o armazenamento dos feijões, pois quando essa grandeza física está elevada, as reações químicas nos grãos são aceleradas e acarretam a perda de qualidade dessa leguminosa (BRAGANTINI, 2005). A umidade elevada também influencia negativamente a manutenção das características dos feijões durante o armazenamento, porque o processo respiratório e o conteúdo de água livre dos grãos são aumentados por essa condição (BRAGANTINI, 2005). Umidade relativa de 11 a 13% e umidade dos grãos (após a colheita) de 12 a 14%, mantêm o processo respiratório baixo, a germinação apreciável, a cor do tegumento e a estabilidade microbiana dos feijões, resultando na manutenção da qualidade dessa leguminosa durante o armazenamento (BRAGANTINI, 2005; RANI et al., 2013). Feijões com conteúdo de umidade maiores (18% a 20%) após a colheita e submetidos ao armazenamento a temperaturas mais elevadas (30°C e 40°C), apresentaram significativo escurecimento do tegumento dos grãos, além da perda da viabilidade das sementes após 3 a 5 semanas (RANI et al., 2013).

O escurecimento dos grãos e os defeitos texturais conhecidos como *hardshell* (casca dura) e *hard-to-cook* – HTC (difícil-de-cozinhar) são as principais deteriorações que ocorrem em feijões e em outras leguminosas durante o armazenamento em condições inadequadas (STANLEY; AGUILERA, 1985; REYES-MORENO; PAREDES-LÓPEZ; GONZALEZ, 1993; LIU; BOURNE, 1995). No primeiro fenômeno, a casca torna-se impermeável a água devido o endurecimento dessa estrutura, enquanto que no HTC ocorre o endurecimento dos cotilédones e alterações de aderência entre as células do grão (WHETTEN; SEDEROFF, 1995; BATISTA; PRUDÊNCIO; FERNANDES, 2011). Esses fenômenos são resultantes de modificações na fisiologia e na composição química dos grãos e, são determinados pelas condições ambientais de armazenamento e por características genéticas de propensão ou

resistência dos grãos aos processos de perda de qualidade (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005; SIQUEIRA et al., 2014).

Muitos mecanismos bioquímicos estão envolvidos com essas alterações da qualidade máxima dos grãos de feijão. O escurecimento e o defeito textural *hardshell* do feijão comum estão relacionados com as alterações na atividade de enzimas e no conteúdo de fenólicos ao longo do armazenamento (STANLEY, 1992; NASAR-ABBAS et al., 2009). O estresse ambiental durante o armazenamento aumenta a atividade enzimática nos grãos, resultando na oxidação de polifenóis por oxidoredutases, na polimerização de compostos fenólicos e formação de taninos e lignina nos grãos (MARTÍN-CABREJAS et al., 1997). A peroxidase, uma das enzimas envolvidas nesses processos, catalisa a polimerização dos precursores de fenilpropanóides de lignina, contribuindo para a formação de lignina nos grãos (ABELES; BILES, 1991). A associação da lignina com os polissacarídeos das paredes celulares confere a rigidez, força de compressão, hidrofobicidade e impermeabilidade à água das paredes celulares dos grãos (WHETTEN; SEDEROFF, 1995).

O HTC está relacionado com alterações nos cotilédones envolvendo as reservas de amido e proteína, por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (LIU; BOURNE, 1995). A insolubilização dos componentes da parede celular dos grãos limita a absorção de água pelas células, acarretando na redução ou retardo da gelatinização do amido e na desnaturação da proteína (SHIGA; LAJOLO; FILISETTI, 2004; NJOROGE et al., 2015, 2016). Consequentemente, há redução da resistência da membrana celular à entrada de água (pressão do turgor) e aumento da coesão entre as células, modificações não enzimáticas que resultam na dureza dos feijões armazenados (SHIGA; LAJOLO; FILISETTI, 2004). A desmetilação das pectinas por pectinesterases, produção de pectina de cálcio insolúvel pela fitase, hidrólise de proteínas por proteases e a oxidação de lipídios por lipoxigenases também são alterações que aumentam a dureza dos grãos (HTC) e resultam das interações de substratos/co-substratos e enzimas após a ruptura das membranas celulares durante a colheita do feijão e em condições adversas de armazenamento (STANLEY; AGUILERA, 1985; HOHLBERG; STANLEY, 1987; RIVERA et al., 1989; LIU; PHILLIPS; HUNG, 1992; GALIOTOU-PANAYOTOU; KYRIAKIDIS; MARGARIS, 2008).

Essas modificações fisiológicas dos grãos resultam na menor aceitabilidade do feijão, pois diante de feijões mais escuros e endurecidos o consumidor tende a aplicar um maior tempo de cocção para amaciar as estruturas dessa leguminosa, e conseqüentemente, os grãos perdem textura, sabor e valor nutricional (GARCIA et al., 1998; KIGEL, 1999; REYES-MORENO; PAREDES-LÓPEZ; GONZALEZ, 1993; SCHOENINGER et al., 2013). Portanto, características de rápido escurecimento nos feijões tipo carioca influenciam negativamente na qualidade e aceitação comercial, sensorial e nutricional dos grãos (BASSINELLO et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2016ab).

Diante desses problemas econômicos gerados pela perda de qualidade de grãos, pesquisas de melhoramento genético aprovadas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, foram desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). O resultado de mais de 10 anos de pesquisa realizada pela EMBRAPA Genética Recursos e Biotecnologia (Brasília, DF) e Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia, GO), foram cultivares geneticamente modificados promissores do ponto de vista econômico e ambiental (BRASIL, 2010; MARTINO et al., 2012). Os genótipos BRSMG Madrepérola, IAC Milênio, IAC Alvorada, BRS Requite e ANFC9, são feijões tipo carioca, disponíveis no mercado, com características de lento escurecimento (LE) durante o armazenamento (FARIA et al., 2004; CARNEIRO et al., 2012; CONAB, 2015). A qualidade comercial e a aceitabilidade pelos consumidores de um novo cultivar de feijão são definidos por aspectos comerciais (cor, brilho, forma e tamanho do grão), por características culinárias (sabor, textura, tempo de cocção e consistência do caldo) e pela qualidade nutricional (conteúdos de proteína, fibra alimentar e compostos fenólicos) (BASSINELLO et al., 2003).

A avaliação tecnológica do genótipo de feijão carioca IAPAR-81 por Coelho e colaboradores (2011), demonstrou que o conteúdo de proteína não foi modificado após o armazenamento do feijão (75 dias a 40°C/76% UR), entretanto, o percentual de proteína solúvel reduziu significativamente ao longo desse processo. Essa alteração está relacionada a desnaturação de proteínas e contribuiu, entre outros mecanismos, com desenvolvimento do HTC nos feijões (LIU; BOURNE, 1995; SHIGA; LAJOLO; FILISSETTI, 2004; COELHO et al., 2011).

O armazenamento (30°C/75% UR) do feijão carioca Pérola por oito meses aumentou a concentração de polissacarídeos insolúveis e reduziu o conteúdo de polissacarídeos solúveis em água no tegumento dos grãos (SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011). Essas mudanças no padrão de polissacarídeos reduziram a solubilização e a hidrólise dos polissacarídeos não amiláceos e alteraram consideravelmente o perfil de fibra alimentar no feijão avaliado (SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011).

O armazenamento de quatro variedades de feijão Pinto, feijão canadense semelhante em coloração ao grupo carioca, em quatro condições de temperatura e umidade (25°C/75% UR; 35°C/75% UR; 45°C/75% UR; 35°C/83% UR) por seis a 12 meses, resultou no desenvolvimento de HTC nos feijões (NJOROGÉ et al., 2015). Nesse estudo, a perda de qualidade dos feijões foi associada à redução da extração de pectina, da hidrólise do amido e de proteínas em função do aumento do tempo, da temperatura e da umidade relativa de armazenamento (NJOROGÉ et al., 2015).

Siqueira e colaboradores (2014), observaram que a variabilidade genética determinou a intensidade do escurecimento e endurecimento de genótipos de feijão carioca com características de lento e regular escurecimento, durante o armazenamento (cinco meses) em condições ambientais (22-25°C/34-84% UR). No genótipo de lento escurecimento BRSMG Madrepérola as alterações de qualidade foram menos intensas, enquanto que no BRS Pontal, genótipo de escurecimento regular, o armazenamento prolongou o tempo de cocção e promoveu escurecimento (baixos valores de L*) dos grãos (SIQUEIRA et al., 2014).

Em outros dois estudos com períodos e condições ambientais de armazenamento diferente (zero a quatro meses, a 40°C ± 5°C/75% UR), Siqueira e colaboradores (2016ab) observaram que além da intensidade, a variabilidade genética também influencia os mecanismos dos fenômenos de escurecimento e HTC durante o armazenamento dos feijões. Os genótipos de escurecimento regular e mais suscetíveis ao HTC, BRS Pontal e Pérola, apresentaram maior resistência ao cozimento, dureza instrumental, capacidade de absorção de água, conteúdo de fenólicos e maior atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase após a colheita e durante o armazenamento (SIQUEIRA et al., 2016a). Nos genótipos de lento escurecimento (BRSMG Madrepérola e CNFC 10467) as alterações de cor estão relacionadas principalmente

com a atividade da polifenoloxidase, enquanto que nos feijões mais propensos (BRS Pontal e Pérola) o escurecimento ocorre pela combinação da oxidação enzimática e não enzimática (SIQUEIRA et al., 2016b). Os genótipos de regular escurecimento apresentaram maior conteúdo de flavonoide, proantocianidina e de fenólicos totais durante o armazenamento, essa diferença no perfil de fenólicos determina a coloração dos feijões, pois esses compostos são os substratos das reações de oxidação e dos tipos de pigmentos (SIQUEIRA et al., 2016b).

O genótipo BRSMG Madrepérola foi o feijão tipo carioca mais resistente aos processos de escurecimento e endurecimento dos grãos durante o armazenamento em condições distintas (SIQUEIRA et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2016ab). Esses estudos comprovam que o Programa de Melhoramento do Feijoeiro (EMBRAPA Arroz e Feijão) é fundamental para o desenvolvimento de novas linhagens de feijão e, conseqüentemente, para a redução das perdas desse produto no mercado durante o armazenamento (SIQUEIRA et al., 2014).

4 METODOLOGIA GERAL

O estudo foi realizado nos laboratórios de Nutrição Experimental e de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), nos laboratórios de Metabolismo e Fermentação e de Bioquímica e Biologia Celular de Agentes Infecciosos e Parasitários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) e no laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pertencentes à Universidade Federal de Viçosa (UFV – Viçosa, Minas Gerais).

4.1 Delineamento experimental

4.1.1 Delineamento experimental – Artigo 1

Os feijões comuns (*Phaseolus vulgaris* L.), tipo comercial carioca (BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal) e tipo Pinto Bean (linhagem canadense 1533-15), foram cultivados na EMBRAPA Arroz e Feijão, fazenda Capivara, em Santo Antônio de Goiás/GO. O delineamento experimental foi realizado em blocos ao acaso, com um esquema fatorial 5x3x2x1, sendo cinco as linhagens de feijão (sendo um controle - Pinto Bean, dois resistentes ao escurecimento - BRSMG Madrepérola e CNFC 10467, e dois susceptíveis - BRS Estilo e BRS Pontal), três as repetições, dois os períodos de avaliação (após a colheita - tempo zero e 180 dias - seis meses de armazenamento) e um a temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ /umidade relativa 71,5%). As linhagens de feijão foram cultivadas simultaneamente, dias 26 e 27 de maio de 2014, constituindo-se cada uma, um bloco e o armazenamento dos feijões foi iniciado logo após a colheita (agosto e setembro de 2014), limpeza, secagem (13% umidade) e expurgo do material (Figura 1). As análises laboratoriais das amostras foram realizadas em triplicata e duplicata.

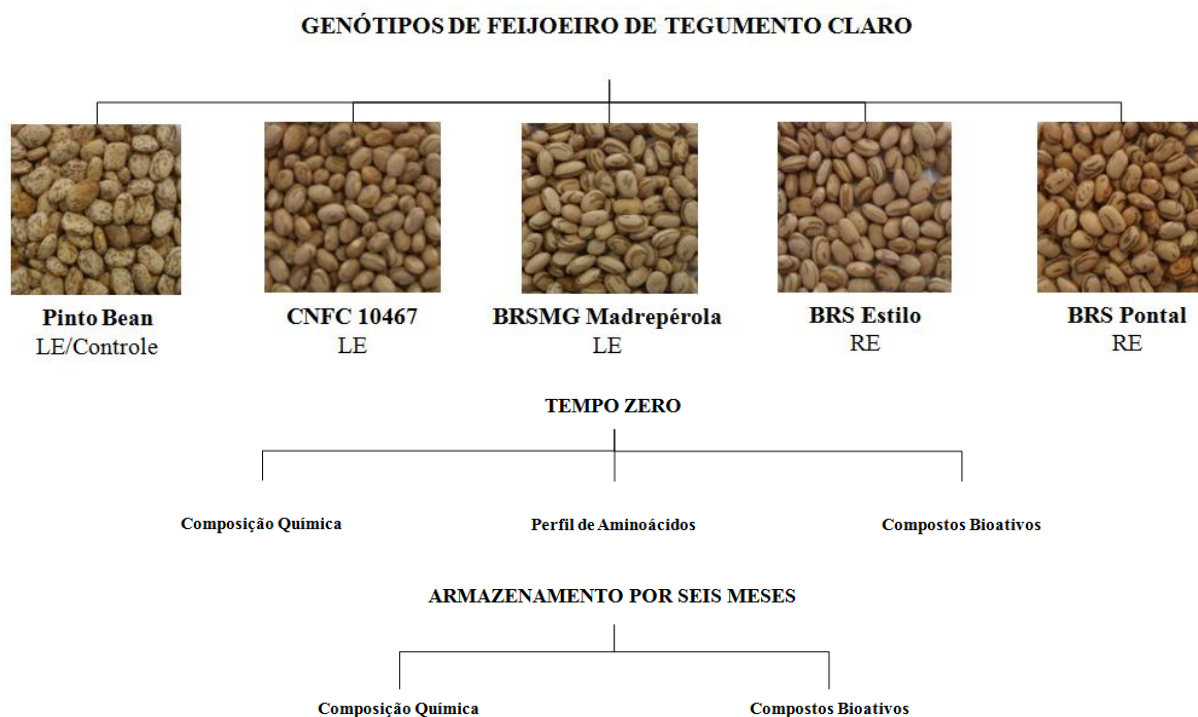


Figura 1. Delineamento experimental do artigo 1.
LE: lento escurecimento, RE: rápido escurecimento.

4.1.2 Delineamento experimental – Artigo 2

O presente ensaio biológico foi a continuidade das investigações *in vitro* realizadas por membros do nosso grupo de pesquisa (ALVES et al., 2016ab), nas quais foram observadas que a inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos humanos (macrófagos THP-1) foi reduzida pelas propriedades biológicas dos peptídeos bioativos do hidrolisado proteico do feijão cozido BRSMG Madrepérola armazenado por seis meses ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ /umidade relativa $<65\%$).

O número de animais (n mínimo= 8) foi definido segundo cálculo amostral (CEUA - ENSP, 2015; CEUA - UNB, 2015; ENG, 2003) e o ensaio biológico foi conduzido por 9 semanas. O efeito da farinha de feijão cozido (WF) e do hidrolisado proteico de feijão carioca (PH) no estresse oxidativo e no processo inflamatório foi avaliado por meio do ensaio biológico com os seguintes grupos experimentais: controle normal (AIN-93M), controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico (HFCD), HFCD adicionada de farinha integral de feijão cozido (HFCD-WF) (346,60 g/Kg de dieta) e

HFCD e hidrolisado proteico por gavagem (700 mg/Kg de animal/dia) (HFCD-PH) (Figura 2).

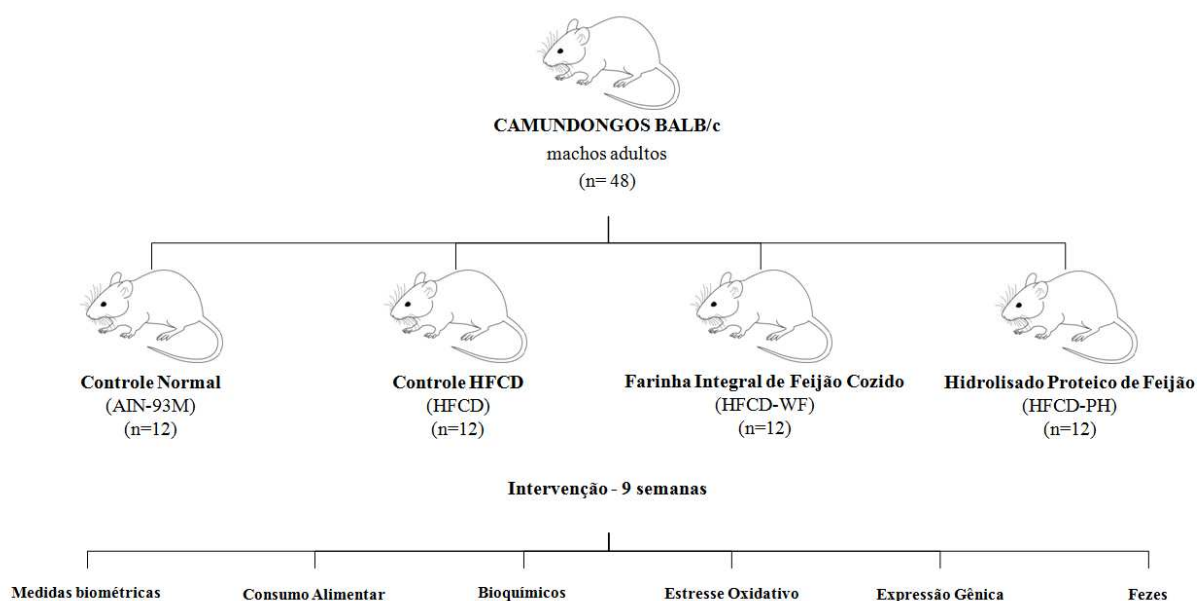


Figura 2. Delineamento experimental do artigo 2.

HFCD: dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica; WF: farinha integral de feijão; PH: hidrolisado proteico de feijão.

4.2 Matéria-prima

4.2.1 Genótipos de feijão

Os genótipos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto Bean, feijão canadense semelhante em coloração ao grupo carioca, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal, feijões tipo comercial carioca, foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA Arroz e Feijão. O Pinto Bean e os feijões tipo carioca tem origem mesoamericana e ambos são feijões considerados miúdos (20 a 30 g de peso/massa de 100 grãos) e de tegumento de fundo claro (marrom claro/bege), porém são de grupos comerciais de feijões distintos devido a diferenças morfológicas e de origem dos grãos (GRAHAM; RANALLI, 1997; JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2008; EMBRAPA, 2017). O Pinto Bean apresenta pontuações (“pintas”) marrons escuras nos grãos, enquanto que os feijões tipo carioca possuem listras marrons escuras nos grãos (MARLES; VANDENBERG; BETT, 2008). Além disso, o Pinto Bean é classificado como feijão tipo exportação, pois não tem origem no Brasil, enquanto que os feijões tipo carioca surgiram no Brasil por meio de mutação espontânea (ALMEIDA; LEITÃO FILHO; MIYASAKA, 1971).

Os genótipos BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal foram obtidos do Programa de Melhoramento Genético de Feijoeiro da EMBRAPA Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil. A linhagem Pinto Bean 1533-15 foi proveniente do Canadá (University of Saskatchewan), e passou por quarentena na Embrapa Recursos Genéticos em Brasília, e posteriormente, as sementes foram enviadas para armazenamento no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão para uso em projetos de pesquisa e no programa de melhoramento genético da empresa. Os feijões usados na presente pesquisa são contrastantes para o processo de escurecimento dos grãos, sendo o Pinto Bean uma linhagem (1533-15) de feijão canadense de lento escurecimento (LE/Controle), BRSMG Madrepérola e CNFC 10467, respectivamente, cultivar e linhagem de LE, e BRS Estilo e BRS Pontal, cultivares de rápido escurecimento (RE) (DEL PELOSO et al., 2003; JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2008; MELO et al., 2011; SILVA et al., 2011; CARNEIRO et al., 2012).

A semeadura dos grãos ocorreu nos dias 26 e 27 de maio de 2014 em sistema de plantio direto, com espaçamento de 0,45 m de linha, 12 sementes por metro, com adubação de base com fosfato monoamônico (MAP) (04-52-00) (200 Kg/ha) e adubação de cobertura com uréia (200 Kg/ha). A colheita dos feijões ocorreu durante os meses de agosto e setembro de 2014, na Fazenda Capivara da EMBRAPA Arroz e Feijão. Após a colheita (tempo zero), limpeza e secagem, os grãos foram expurgados com fosfato de alumínio (Fosfina), 3 g de produto comercial por tonelada de grão, em câmara de alvenaria vedada com cobertura plástica por cinco dias com o objetivo de eliminar pragas dos feijões antes do armazenamento. Em seguida, as amostras foram quarteadas, separadas em três repetições e armazenadas em câmara fria a temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ por seis meses (180 dias), em sacos de tecido. A umidade relativa do ar não foi controlada durante o armazenamento, apenas monitorada e registrada. Ao fim dos processos de colheita (tempo zero) e armazenamento por seis meses, uma parcela dos grãos crus foram triturados em moinho de martelo (CT 1093 Cyclotec, Foss®, Hillerød, Dinamarca), provido de peneira (500 μm , 35 mesh) e embalados a vácuo. Os grãos restantes e as farinhas dos feijões crus foram enviados ao Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidos sob refrigeração à -18°C até o momento da caracterização da composição nutricional, química e de compostos bioativos das farinhas dos genótipos de feijão.

4.2.2 *Cocção e processamento*

O genótipo com as melhores concentrações de proteína, amido resistente e fenólicos totais (BRSMG Madrepérola armazenado por seis meses) foi selecionado e seus grãos foram processados para a obtenção da farinha integral de feijão cozido, a qual foi ofertada na dieta experimental dos animais. O feijão foi cozido sob pressão em calor úmido (proporção de 1:2, p/v) por 50 ± 5 min, sem maceração prévia, em triplicata, até atingir consistência macia, própria para consumo. A proporção de água usada na cocção não gerou caldo residual e os grãos cozidos foram secos em estufa com circulação de ar (MA 035, Marconi®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 8 horas à 60°C e triturados em moinho analítico (Grinder Vertical Rotor MA 090 CET, Marconi®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com peneira de 600 μm , 30 mesh (DIAS et al., 2015; ALVES et al., 2016a). As farinhas integrais de feijão cozido obtidas nas repetições do processamento dos grãos foram embaladas a vácuo e mantidas à -20°C até o momento da obtenção do hidrolisado proteico, do ensaio biológico e da análise de compostos fenólicos totais.

4.2.3 *Hidrolisado proteico*

O hidrolisado proteico do feijão cozido (BRSMG Madrepérola armazenado por seis meses) foi preparado no Laboratório “*Food Science and Human Nutrition in University of Illinois at Urbana-Champaign-USA*”. Este foi obtido por meio de digestão enzimática simulada com as enzimas pepsina e pancreatina, conforme metodologia proposta por Megías et al. (2004), modificado por Alves et al. (2016a). Brevemente, a farinha de feijão cozido foi suspensa em água (1:20 p/v) e a digestão enzimática foi realizada com pepsina (1:20 p/p; pepsina:substrato), pH 2,0, a 37°C por duas horas, seguido por mais duas horas de digestão com pancreatina (1:20 p/p; pancreatina:substrato), pH 7,5, a 37°C. A hidrólise foi interrompida por aquecimento à 75°C por 20 minutos. Os hidrolisados resultantes foram centrifugados (20.000 x g; 4°C, 15 minutos) e dializados. A diálise para remoção de sais foi realizada por filtração em membrana de celulose com ponto de corte de 500 Daltons (Da) (Z367982, Sigma-Aldrich). As amostras foram liofilizadas em liofilizador (LabConco, Kansas, Missouri, Estados Unidos) e armazenadas à -20°C até o momento do ensaio biológico e da análise de compostos fenólicos totais.

4.3 Caracterização química e de compostos bioativos

4.3.1 Perfil e escore químico de aminoácidos (EQA)

O perfil de aminoácidos dos genótipos BRSMG Madrepérola e CNFC 10467 (LE) e BRS Estilo e BRS Pontal (RE) foi determinado no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro. Os efeitos do tempo de armazenamento não foram investigados sobre o perfil de aminoácidos, portanto, somente os feijões no tempo zero foram avaliados. As farinhas de feijão cru desengorduradas foram hidrolisadas de três formas distintas para análise de aminoácidos: hidrólise com ácido clorídrico 6 N por 22 horas a 105°C, hidrólise com ácido per fórmico a 0°C por 16 horas seguida de hidrólise ácida (aminoácidos sulfurados) e hidrólise alcalina com hidróxido de sódio 4,2 N a 110°C por 22 horas (triptofano) (AOAC, 2000; LIU et al., 1995).

As amostras foram submetidas à reação de derivatização com a solução de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidila (AMQ), exceto as amostras de triptofano, aminoácido fluorescente na análise em coluna de fase reversa com detecção fluorimétrica. As soluções derivatizadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência no sistema cromatográfico Alliance® Waters 2695 com detectores de fluorescência 2475 e de arranjo de fotodiodos 2996 (PDA), em coluna Nova-Pak® C18. Os cromatogramas foram obtidos a 395 nm, 250 nm e 254 nm (AOAC, 2000; LIU et al., 1995).

O escore químico de aminoácidos (EQA) é um método de avaliação da qualidade da proteína do alimento baseada na determinação do aminoácido limitante. São consideradas proteínas de alto valor nutricional, aquelas que apresentam escore químico maior que 1,0 para todos os seus aminoácidos. Foi denominado aminoácido limitante o aminoácido que apresentou escore químico menor que 1,0 (FAO/WHO, 1991). Para o cálculo do EQA, os conteúdos de aminoácidos foram expressos em miligramas de aminoácidos por grama de proteína da amostra e divididos pelos valores padrões de aminoácidos de referência da FAO/WHO (2007). As concentrações de proteína das amostras utilizados no cálculo do EQA foram determinadas pelo método de Kjeldahl, utilizando-se fator de conversão de proteína de 6,25 (AOAC, 2016) (Método 960.52).

4.3.2 *Análise da composição química*

A composição química dos genótipos Pinto Beans, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal foi avaliada utilizando os procedimentos analíticos preconizados pela *Association of Official Analytical Chemists - AOAC* (2016), nos laboratórios de Análise de Alimentos (DNS), Metabolismo e Fermentação (DBB), Tecnologia de Alimentos (DTA) e Nutrição Experimental (DNS). A umidade foi determinada pelo método gravimétrico (Método 934.01), cinzas por calcinação (Método 923.03), proteína pelo método de Kjeldahl e aplicando-se o fator de conversão de proteína de 6,25 (Método 960.52), lipídios por extração em aparelho de Soxhlet (Método 920.39), os conteúdos de fibra alimentar total, fração solúvel e insolúvel pelo método enzimático gravimétrico (Método 985.29). O conteúdo de carboidratos foi calculado por meio da diferença entre o total da amostra e os conteúdos de proteínas, lipídios, fibra alimentar, umidade e cinzas (AOAC, 2016). O valor energético foi determinado utilizando os fatores de conversão 4, 4 e 9 kcal/g de alimento para carboidratos, proteínas e lipídios, respectivamente (FRARY; JOHNSON, 2005).

4.3.3 *Fibra alimentar*

Os conteúdos de fibra alimentar total, fração solúvel e insolúvel dos genótipos Pinto Beans, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal foram determinados por meio de métodos enzimáticos e gravimétricos (AOAC, 2016) (Método 985.29), no laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV). Foram utilizadas as enzimas α -amilase termorresistente, protease e amiloglicosidase do kit *Total dietary fiber assay* (Sigma[®]) para a hidrólise das amostras e cadinhos com placa de vidro, porosidade n^o2 (ASTM 40-60mesh), com celite (Sigma[®]) para a filtração dos hidrolisados. A concentração de fibra alimentar total foi obtida por meio da soma entre os resíduos insolúvel e solúvel menos o conteúdo de proteína e cinzas dos mesmos.

Os cadinhos usados na filtração das amostras foram limpos com detergente neutro (Vetec[®]) a 20%, lavados com água destilada, secos em estufa (Marconi[®], modelo MA-035/5, Piracicaba, Brasil) a 105°C por 1 hora e incinerados em mufla (Quimis[®], modelo 318, Diadema, Brasil) a 525°C por 7 horas. Em seguida, foram lavados com HCl 0,5N e água destilada, secos em estufa a 105°C por 12 horas e, após o resfriamento em dessecador, os cadinhos foram pesados e adicionados de 1 g de celite. Os cadinhos com celite foram secos a 105°C por 12 horas e posteriormente pesados.

Para obtenção do hidrolisado, 1 g das amostras secas e desengorduras foram pesadas em quadruplicata e adicionadas de 50 mL de tampão fostato pH $6,0 \pm 0,2$. Em seguida, foi acrescentado 0,1 mL de α -amilase e as amostras foram incubadas em banho metabólico (Marconi[®], modelo MA 093, Piracicaba, Brasil) a 97°C durante 30 minutos, com agitação horizontal por ± 15 segundos (100 rpm) a cada 5 min. Após resfriadas, as amostras tiveram seu pH ajustado para $7,5 \pm 0,1$ com NaOH 0,275 N, foram adicionadas de 0,2 mL de protease (5 mg/0,2 mL) e incubadas à 60°C por 30 minutos, com agitação contínua (100 rpm). Em seguida, o pH dos hidrolisados resfriados foi ajustado para $4,3 \pm 0,3$ com HCl 0,325 N e as soluções foram adicionadas de 0,1 mL de amiloglicosidase e incubadas a 60°C por 30 min com agitação contínua (100 rpm) para obtenção do hidrolisado final.

Os hidrolisados foram filtrados nos cadinhos com celite em bomba de vácuo (Marconi[®], modelo MA-058, Piracicaba, Brasil) para obtenção da fração insolúvel da fibra. Em seguida, esses cadinhos foram lavados com etanol 95% e acetona, secos em estufa a 105°C durante 12 horas, pesados e seus resíduos foram analisados quanto aos conteúdos de proteína e cinzas para quantificação da fibra insolúvel (AOAC, 2016) (Métodos 960.52 e 923.03). Os volumes obtidos da filtração dos hidrolisados foram reservados e adicionados de álcool 98% aquecido a 60°C para obtenção da fração solúvel. Após 1 hora de precipitação, os conteúdos foram filtrados em cadinhos e os mesmos foram lavados com etanol 95% e acetona, secos em estufa a 105°C durante 12 horas, pesados e seus resíduos também foram analisados quanto às concentrações de proteína e cinzas (AOAC, 2016) (Métodos 960.52 e 923.03).

4.3.4 *Amido resistente*

O conteúdo de amido resistente dos genótipos Pinto Beans, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal foi determinado por meio da digestão simulada com α -amilase pancreática e amiloglicosidase, extração dos componentes diferentes do amido resistente (exemplo: amido solubilizado), e leitura indireta da fração do componente de interesse por espectrofotometria a 510 nm por meio dos procedimentos e kit enzimático da Megazyme[®] (AOAC, 2016) (Método 2002.02).

Para hidrólise e solubilização do amido não resistente das amostras, 100 ± 5 mg das farinhas de feijão foram pesadas em tubos e adicionadas de 4 mL de solução de α -amilase pancreática contendo amiloglicosidase a 1%, agitadas em vórtex e incubadas em banho Maria a 37°C por 16 horas, com agitação contínua (200 rpm). Em seguida, os hidrolisados foram tratados com 4 mL de etanol 99%, agitados em vórtex e centrifugados por 10 minutos à 1.000 x g (204 NR, FANEM®, São Paulo, Brasil). O sobrenadante resultante desse processo foi descartado e o precipitado foi resuspenso com 2 mL de etanol 50% sob agitação em vórtex, seguida da adição de mais 6 mL de etanol 50%, agitação e centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante gerado também foi descartado e a resuspensão do precipitado, centrifugação e o descarte do sobrenadante derivado foram repetidos.

Aos sedimentos decorrentes da centrifugação foram adicionados 2 mL de solução de KOH 2 M para dissolver o amido resistente a amido sob agitação vigorosa em banho de gelo por 20 minutos. Seguidamente, as soluções foram neutralizadas com 8 mL de solução de acetato de sódio 1,2 M (pH 3,8) e adicionadas de 0,1 mL de amiloglicosidase, seguido de agitação em vórtex e incubação em banho Maria a 50°C por 30 minutos, com agitação também em vórtex a cada 10 minutos para hidrolisar o amido derivado do amido resistente em D-glucose. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 1.000 x g e o sobrenadante resultante foram diluídos com água destilada em balões volumétricos de 50 mL. Alíquotas de 0,1 mL dos diluídos foram acrescidas de 3,0 mL do reagente de *Glucose Determination* (GOPOD) e incubadas em banho Maria a 50°C por 20 minutos para medir a D-glucose. Alíquotas do branco (água) e do padrão (D-glucose) também foram adicionados de GOPOD e incubados sob as mesmas condições. O amido resistente foi mensurado indiretamente por leitura da absorbância da D-glucose a 510 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Evolution 60S, EUA). A planilha disponível na plataforma online do fornecedor do Kit (www.megazyme.com) foi usada para o cálculo do conteúdo de amido resistente das amostras.

4.3.5 *Fenólicos totais*

O total de compostos fenólicos nas farinhas cruas dos genótipos Pinto Beans, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal e na farinha e no hidrolisado proteico de feijão BRSMG Madrepérola cozido foi determinado utilizando o

reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Inicialmente, foram adicionados 20 mL de metanol 60% a 2 g das farinhas cruas de feijão, seguida de agitação por 20 minutos e filtração dessa mistura para obtenção dos extratos (BLOOR, 2001). Para a análise, 100 µL dos extratos foram adicionados de 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu 0,25 N e mantidos em repouso por 3 minutos. Em seguida, a solução foi acrescida de 1 mL de carbonato de sódio 7,5%, agitada e a reação com as amostras permaneceu em repouso por 7 minutos. Por fim, 5 mL de água destilada foram adicionados e a mistura foi agitada e mantida em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). A leitura da absorbância das amostras foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 726 nm. A quantificação dos fenólicos totais nas amostras foi determinada por meio de curvas analíticas obtidas com concentrações de ácido gálico de 0 a 250 ppm ($y = 0,0009x - 0,0012$, $R^2 = 0,9965$ - farinhas cruas e cozida de feijão; $y = 0,0009x + 0,0046$, $R^2 = 0,9975$ - hidrolisado proteico de feijão) (APÊNDICE 1 e 2). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g⁻¹).

4.3.6 *Flavonoides totais*

O conteúdo total de flavonoides nas farinhas cruas dos genótipos Pinto Beans, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal foi determinado de acordo com Zhishen, Mengcheng, e Jianming (1999). Os extratos foram obtidos segundo metodologia de Bloor (2001). Para a análise, 100 µL dos extratos de feijão foram adicionados de 50 µL de nitrito de sódio (NaNO₂) 5% e mantidos em repouso por 6 minutos. Em seguida, acrescentou-se 500 µL de cloreto de alumínio (AlCl₃) 10% e aguardaram-se 7 minutos a reação com as amostras em repouso, complexação flavonoide-alumínio. Por fim, 250 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M foram adicionados e a mistura foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C). A leitura da absorbância dos sobrenadantes das amostras foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 510 nm. A quantificação dos flavonoides totais dos feijões crus foi determinada por meio de curva analítica obtida com concentrações de catequina de 0 a 250 ppm ($y = 0,0001x + 0,0000$, $R^2 = 0,9925$) (APÊNDICE 3). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina por grama de amostra (mg EC/g⁻¹).

4.3.7 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante das farinhas cruas dos genótipos Pinto Beans, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467, BRS Estilo e BRS Pontal foi determinada por meio da atividade de retirada de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (BLOIS, 1958). Os extratos foram obtidos segundo metodologia de Bloor (2001). Adicionou-se 1,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,1mM a 100 µL dos extratos. Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e incubada por 30 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O controle foi preparado utilizando-se 100 µL de água destilada em substituição aos extratos e sob as mesmas condições das amostras. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 517 nm e para realização do teste, assegurou-se que a absorbância do controle estivesse entre 0,9 a 1,0. A atividade de retirada de radical (AAR) dos feijões crus foi calculada segundo a equação: $AAR\% = [(Absorbância\ do\ controle - Absorbância\ da\ amostra) / Absorbância\ do\ controle] \times 100$.

A capacidade antioxidante das amostras de feijão cru foi comparada a padrões de ácido ascórbico (AA) e butilhidroxitolueno (BHT) por meio das equações obtidas com concentrações de 3,125 a 100 µg/mL dos respectivos padrões: AA: $y = 14,53\ln(x) + 21,10$, $R^2 = 0,973$; BHT: $y = 25,65\ln(x) - 5,427$, $R^2 = 0,856$ (MOREIRA et al., 2013). O valor de “y” da equação foi substituído pelo percentual de sequestro de DPPH (AAR%) das amostras de feijão e desta forma inferiu-se o teor de substâncias sequestrantes equivalentes a concentrações de AA (µg/mL) e BHT (µg/mL).

4.4 Identificação de compostos fenólicos

O perfil de compostos fenólicos da farinha e do hidrolisado proteico de feijão BRSMG Madrepérola cozido foi determinado no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

Os extratos foram preparados utilizando-se 400 mg do hidrolisado proteico e 10 mL da solução metanol/água/ácido clorídrico (50:48:2). O material foi sonificado por 1 hora e a mistura foi centrifugada a 1.610 x g (CM-610, HT®, Taiwan). Uma alíquota de 1,5 mL do extrato foi filtrada em membrana de politetrafluoretileno (PTFE), com 0,22 µm de porosidade e colocada em *vials* para análise de cromatografia líquida de alta

eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-ESI-QTOF-MS/MS) (Acquity® UPLC/XEVO®, Waters®, Milford, Massachusetts, Estados Unidos).

As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna Waters, modelo Acquity UPLC® BEH-18 - Waters® (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40°C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; 15,1-17 min (100%) de B; 17,1-19,1 min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL. O modo ESI foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350°C, fluxo do gás dessolvatação de 350 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Em baixo *scan*, a tensão de cone foi 35 V, energia de colisão de 5 eV (trap). Em alto *scan*, a tensão do cone foi de 35 V, com uma rampa de energia de colisão de 20-40 rampa eV (trap). Leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software *Masslynx* 4.1 (Waters Corporation) (HUANG et al., 2013; ISWALDI et al., 2013; JOURNI et al., 2015; SINGH et al., 2015).

As estruturas dos fenólicos identificados na farinha integral e no hidrolisado proteico de feijão cozido foram obtidos na base de dados PubChem Compound, hospedada na plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4.5 Ensaio biológico

O efeito da farinha integral de feijão cozido e do hidrolisado proteico de feijão carioca no estresse oxidativo e no processo inflamatório foi avaliado por meio do ensaio biológico com os grupos experimentais: controle normal (AIN-93M), controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico (HFCD), HFCD adicionada de farinha integral de feijão cozido (HFCD-WF) e HFCD e hidrolisado proteico (HFCD-PH).

4.5.1 Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 48 camundongos machos adultos (*Mus musculus*, classe Rodentia), linhagem BALB/c, obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram divididos em 4 grupos (AIN-93M, HFCD, HFCD-WF, HFCD-PH) com 12 animais em cada, com distribuição de peso semelhante (33,28 g ± 2,82 g), de acordo com a AOAC (2016). Os

animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inox, em ambiente com temperatura controlada a $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro e escuro de 12 horas.

O controle normal (n= 12) recebeu dieta AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e os demais grupos (n= 36) consumiram dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica (HFCD) (ANANDHI; THOMAS; GERALDINE, 2014; COLINA-COCA et al., 2014) e água destilada *ad libitum*. O grupo HFCD-WF consumiu farinha integral de feijão cozido adicionada a dieta HFCD (346,60 g/Kg de dieta) e o grupo HFCD-PH recebeu hidrolisado proteico de feijão por gavagem (700 mg/Kg de animal/dia) como tratamento durante nove semanas.

A composição das dietas experimentais (Tabela 1) foi baseada na AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), indicada para roedores adultos. A dieta HFCD consistiu na AIN-93M suplementada com 2% de colesterol, 0,5% de ácido cólico (COLINA-COCA et al., 2014), 20% de sacarose e 20% de gordura hidrogenada (ANANDHI; THOMAS; GERALDINE, 2014). A dieta HFCD adicionada de farinha integral de feijão cozido foi formulada considerando-se que 50% de seu conteúdo proteico é proveniente do feijão e para que todas as dietas apresentassem a mesma quantidade de fibras e distribuição calórica de proteína, foi necessário suplementar a AIN-93M e a HFCD com celulose e caseína (Tabela 1). As dietas foram preparadas manualmente utilizando ingredientes semi-purificados da marca Rhooster®, sendo em seguida armazenados a -18°C .

O 2-thiouracil foi usado com a finalidade de assegurar a indução da hipercolesterolemia e da aterosclerose nos grupos que consumiram dieta HFCD, pois atua inibindo o hormônio da tireoide (JORIS et al., 1983; PELLIZZON, 2008). Este reagente foi diluído no hidrolisado proteico e na água ofertada por gavagem para os grupos controle HFCD e farinha de feijão (HFCD-WF), na concentração de 10 mg/Kg de animal/dia, (PANDA; KAR, 2005; PANDA; KAR; PATIL, 2009). O grupo controle normal (AIN-93M) recebeu água destilada por gavagem em igual volume (500 μL) ofertado aos demais grupos experimentais.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/Kg de dieta)

| Ingrediente (g/Kg) | AIN-93M | HFCD | HFCD-WF | HFCD-PH |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Amido de milho | 422,96 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Farinha de feijão integral cozida | 0,00 | 0,00 | 346,60 | 0,00 |
| Sacarose | 100,00 | 300,00 | 218,63 | 300,00 |
| Gordura vegetal hidrogenada | 0,00 | 200,00 | 200,00 | 200,00 |
| Caseína* | 170,73 | 218,19 | 124,47 | 218,19 |
| Amido dextrinizado | 155,00 | 105,50 | 0,00 | 105,50 |
| Fibra | 62,01 | 62,01 | 0,00 | 62,01 |
| Óleo de soja | 40,00 | 40,00 | 36,00 | 40,00 |
| Mix mineral | 35,00 | 35,00 | 35,00 | 35,00 |
| Mix vitamínico | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| Colesterol | 0,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 |
| Bitartarato de colina | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 |
| Ácido cólico | 0,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| L-cistina | 1,80 | 1,80 | 1,80 | 1,80 |
| Carboidrato (% calorías) | 72,22 | 33,55 | 32,03 | 33,55 |
| Proteína (% calorías) | 18,19 | 18,05 | 17,94 | 18,05 |
| Lipídios (% calorías) | 9,59 | 48,40 | 50,03 | 48,40 |
| Energia (kcal/Kg) | 3754,76 | 4834,76 | 4677,97 | 4834,76 |
| DC (kcal/g⁻¹) | 3,75 | 4,83 | 4,67 | 4,83 |

*Pureza de 82%. AIN93-M; HFDC= dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica; HFCD-WF= HFCD + farinha integral de feijão cozido; HFCD-PH= HFCD + hidrolisado proteico de feijão; DC= densidade calórica.

4.5.2 Eutanásia

Ao final de 63 dias, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com gel (BD Vacutainer®), centrifugados a 1.000 x g por 10 minutos (FANEM®, São Paulo, Brasil) para separação do soro, seguido de armazenamento a -80°C. Após a eutanásia o fígado foi retirado, pesado, sendo que uma parte deste foi imediatamente imersa em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a -80°C até o início das análises.

4.5.3 Aspectos éticos

O ensaio biológico foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFV) da UFV, Viçosa, Minas Gerais, em 04/03/2016, sob o processo nº 97/2015 (ANEXO 1).

4.5.4 Medidas biométricas e de consumo alimentar

O peso dos animais foi registrado semanalmente, enquanto que o consumo alimentar foi controlado diariamente. Ao final do experimento, foi mensurado o comprimento naso-anal (cm) dos animais e o índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela relação entre o peso e o comprimento naso-anal (cm) elevado ao quadrado (KEYS et al., 1972). O índice hepatossomático (IHS) foi calculado pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal multiplicado por 100 (RICKER, 1979).

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação do ganho de peso e a quantidade total de dieta consumida e o coeficiente de eficiência energética (CEE) obtido pela relação entre o ganho de peso corporal dos animais e o total de calorias consumidas multiplicado por 1000 kcal. O consumo de fenólicos foi estimado com base nas concentrações de fenólicos totais da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão.

4.5.5 Análises bioquímicas

Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), triacilglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) por métodos colorimétricos de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin®) no analisador automático para química analítica BS-200 (Mindray®, Shenzhen, China).

4.5.6 Obtenção do homogenato do fígado e quantificação de proteína

Para a obtenção do homogenato, inicialmente foram pesados aproximadamente 100 mg de fígado em microtubos de 2 mL, em seguida, foram adicionados 1 mL de tampão fosfato pH 7,4 e o conteúdo foi macerado com pistilo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos à temperatura de 4°C (Hitachi Koki Co., Ltd®, Tokyo, Japão). A proteína total dos homogenatos foi quantificada segundo

metodologia de Bradford (1976). Os homogenatos foram diluídos na proporção de 1:10, em seguida, 10 µL dessas amostras foram adicionadas de 790 µL de água e de 200 µL do reagente de Bradford. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 595 nm.

A quantificação de proteína nos homogenatos do fígado foi realizada por meio da equação da reta obtida pela construção da curva-padrão com solução de albumina sérica na concentração de 0,2 mg/mL ($y = 22,10x + 0,013$, $R^2 = 0,993$) (APÊNDICE 4). Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL.

4.5.7 Capacidade antioxidante total do fígado e do soro

A capacidade antioxidante total (CAT) do homogenato do fígado e do soro foi avaliada por meio do kit *Antioxidant Assay Kit* (Sigma-Aldrich®). O princípio do ensaio antioxidante é a formação de um radical ferritina de mioglobina a partir de metamoglobina e peróxido de hidrogênio, que oxida o ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico (ABTS) para produzir um cátion radical, ABTS+, um cromógeno solúvel de coloração verde que pode ser determinado espectrofotometricamente a 405 nm. Os antioxidantes presentes nas amostras suprimem a produção do cátion radical numa forma dependente da concentração e a intensidade da cor diminui proporcionalmente. O Trolox, análogo da vitamina E, é utilizado como padrão ou controle antioxidante no ensaio.

Inicialmente, os padrões de Trolox foram preparados nas concentrações: 0; 0,015; 0,045; 0,105; 0,210 e 0,420 mM. Em seguida, a solução de trabalho do substrato ABTS foi preparada adicionando-se 25 mL de peróxido de hidrogênio a 3% a 10 mL de solução de substrato ABTS. Na microplaca foram adicionados nos poços para a curva padrão 10 µL dos padrões de Trolox e 20 µL de solução de trabalho de mioglobina, e nos poços para as amostras testes 10 µL das amostras de homogenato do fígado e do soro e também 20 µL de solução de trabalho de mioglobina. Logo após, foram adicionados 150 µL de solução de trabalho do substrato ABTS e amostras e padrões foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 10 µL de solução de paragem a cada poço e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 405 nm.

A quantificação da CAT das amostras de homogenato do fígado e do soro foi realizada por meio das equações da reta obtida pela construção da curva-padrão de Trolox (Curva-padrão ensaio CAT do fígado: $y = -1,466x + 0,963$, $R^2 = 0,971$; Curva-padrão ensaio CAT do soro: $y = -2,494x + 1,418$, $R^2 = 0,999$) (APÊNDICES 5 e 6). Os resultados da CAT do fígado foram expressos em mM equivalentes de Trolox por mg de proteína (mM/mg proteína) e da CAT do soro em mM equivalentes de Trolox em 1 mL de soro (mM/mL).

4.5.8 *Análise dos níveis de peroxidação lipídica no fígado e no soro*

A peroxidação lipídica no fígado e no soro foi avaliada pela quantificação de malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo celular, por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE; AUST, 1978). A solução de TBARS foi preparada com 15% de ácido tricloroacético (TCA), 0,375% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 0,25 M de ácido clorídrico (HCl). Foram utilizados 50 μ L de soro e 200 μ L de homogenato do fígado na análise, aos quais foram adicionados 400 μ L de solução de TBARS. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex por 5 segundos e colocadas no banho maria a 95°C por 40 minutos. Após este procedimento, as amostras foram resfriadas por 5 minutos e depois adicionadas de 600 μ L de n-Butanol, sendo a mistura agitada em vórtex por 1 a 2 minutos e centrifugadas a 1.400 x g por 10 minutos (Hitachi Koki Co., Ltd®, Tokyo, Japão).

O sobrenadante foi coletado e pipetado em microplaca e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 535 nm. O branco foi preparado utilizando-se tampão fosfato em substituição as amostras e sob as mesmas condições descritas anteriormente. A curva padrão foi preparada com o reagente 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) nas concentrações: 0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mM, recebendo os mesmos tratamentos das amostras e do branco.

A quantificação do MDA nas amostras de homogenato do fígado e de soro foi realizada por meio das equações da reta obtida pela construção da curva-padrão de TEMPO (Curva-padrão ensaio MDA do fígado: $y = 0,095x - 0,122$, $R^2 = 0,880$; Curva-padrão ensaio MDA do soro: $y = 0,111x - 0,140$, $R^2 = 0,967$) (APÊNDICES 7 e 8). Os resultados de MDA do fígado foram expressos em nM/mg de proteína e de MDA do soro em nM/mL de soro.

4.5.9 *Atividade enzimática da superóxido dismutase*

A quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD) é dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. Para preparo de 1 mL de pirogalol 100 μM , foi pesado 0,0126 mg desse reagente e para preparo de 1 mL de brometo de (3-[4,5-dimetiltizol-2H]-2,5-difeniltetrazolium (MTT), foi pesado 0,5 mg do reagente.

Na microplaca foram adicionados nos poços: 30 μL dos homogenatos do fígado, 45 μL de tampão fosfato pH 7,0 nos poços destinados ao branco e 30 μL do mesmo tampão nos poços destinados ao padrão. Depois, em todos os poços foram pipetados: 99 μL de tampão e 6 μL de MTT. O pirogalol no volume de 15 μL também foi adicionado a todos os poços, exceto no branco. Por fim, as amostras foram incubadas à 37°C e ao abrigo da luz por 5 minutos e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 570 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína. Os cálculos foram efetuados em relação ao valor da absorbância do padrão, considerando que a absorbância do padrão equivale a 1 U de SOD, ou seja, 50% de oxidação do pirogalol (MARKLUND, 1985).

4.5.10 *Atividade enzimática da catalase*

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e o oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984). A solução utilizada para determinar a atividade da catalase foi preparada com 25 mL de tampão fosfato pH 7,0 e 40 μL de peróxido de hidrogênio 30%.

O branco foi preparado para cada amostra com a finalidade de zerar o espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Evolution 60S, EUA) a 240 nm, para tal 10 μL dos homogenatos foram acrescidos de 1 mL de tampão fosfato. Para avaliar a atividade enzimática, 10 μL de amostra foi homogeneizada a 1 mL da solução de tampão fosfato com peróxido de hidrogênio e as absorbâncias das amostras foram registradas nos tempos 0, 30 e 60 segundos (cinética enzimática).

Para o cálculo da atividade da catalase, inicialmente, foi quantificada a concentração de proteína em 10 μL de homogenato. Em seguida, a absorbância da

primeira leitura (tempo 0) foi subtraída pela absorvância da última leitura (60 segundos) e o valor obtido foi multiplicado pela constante 2,361 (resultado 1). Depois, a absorvância da primeira leitura (tempo 0) foi multiplicada pela quantidade de proteínas nas amostras (resultado 2). Por fim, o resultado 1 foi dividido pelo resultado do 2 e a atividade da catalase foi expressa como U de catalase/mg de proteína.

4.5.11 Avaliação da expressão gênica de proteínas ligadas ao estresse oxidativo e a inflamação no tecido hepático

O mRNA do fígado foi extraído por moagem do tecido (100 mg) com nitrogênio líquido em gral e pistilo livre de RNase e utilizando-se 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, CA, USA). Os homogeneizados foram transferidos para microtubos e agitados por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados e as amostras foram agitadas e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C (Hitachi Koki Co., Ltd®, Tokyo, Japão). Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, adicionados de 500 µL de isopropanol, agitados por inversão, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Seguidamente, os sobrenadantes das amostras foram descartados e os pellets resultantes das amostras foram tratados com 1 mL de etanol 75% e as misturas foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os pellets foram secos por 2 horas em repouso a temperatura ambiente. Posteriormente, os pellets foram ressuspensos com 50 µL de água miliq tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (Invitrogen, CA, EUA) (DEPC) e armazenados a -80°C. A concentração e pureza dos mRNAs foram quantificadas na placa µDrop por espectrofotômetro a 260/280 nm e 260/230 nm (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO).

Antes da síntese de cDNA, 7 µL dos mRNAs diluídos com água DEPC, na concentração de 2µg de mRNA, foram adicionados de 1 µL de tampão DNase e tratados com 2 µL de DNase (Promega, WI, EUA), durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, 1 µL de *stop solution* foi adicionado às misturas e os mRNAs foram incubados por 10 minutos a 65°C. Por fim, os mRNAs tratados foram resfriados a -20°C.

O kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, EUA) foi usado para a síntese do cDNA. Os mRNAs tratados com DNase foram adicionados de 2 µL do MIX 1 (1 µL de oligo dT 100 µM + 1 µL de dNTPs 10 µM diluídos) e incubados por 5

minutos a 65°C. Após a reação e resfriamento, as misturas foram acrescidas de 7 µL do MIX 2 (4 µL tampão 5x FF, 2µL de DTT 0,1M e 1 µL de RNase *Out*) e de 1 µL de MMLV *transcriptase reverse* (200 U/µL) e incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, os cDNAs foram incubados a 70°C por 10 minutos e, após o resfriamento, a concentração e pureza dos cDNAs foram quantificadas na placa µDrop por espectrofotômetro a 260/280 nm e 260/230 nm (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO).

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR), utilizando o equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific), quantificação por fluorescência SYBR-Green, software Primer Express (Applied Biosystems, CA, EUA) e com o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA). Os genes avaliados foram: *heat shock proteins* (HSP72), superóxido dismutase (SOD), fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB), fator de necrose tumoral α (TNFα); interleucina 10 (IL-10) e receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPARα). A expressão relativa de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As condições de amplificação dos genes, ciclo da PCR, foram a desnaturação inicial de 95°C (10 min.) e então 40 ciclos, com 1 min. de desnaturação (94°C), 1 minuto de anelamento (56°C) e 2 minutos de alongamento (72°C), seguidos da curva padrão de dissociação. Os dados de RT-PCR foram analisados com o método ΔΔCT (HETTINGER et al., 2001).

Os iniciadores da amplificação dos genes foram: GAPDH: senso-AGGTTGTCTCCTGTCCTTTC e antisenso-CTGTTGCTGTAGCCATATTC; TNFα: senso-ACGGCATGGATCTCAAAGAC e antisenso-AGATAGCAAATCGGCTGACG; IL10: senso-ACTACCATAGCCACAACGCA e antisenso-TTTCTGTTTCCTACGGCGCT; NFkB: senso-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA e antisenso-TCGCACTTGTAACGGAAACG; PPARα: senso-CCTGCCTTCCCTGTGAACT e antisenso-ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA; SOD: senso-TGTGTCCATTGAAGATCGTGTG e antisenso-CTTCCAGCATTTCAGTCTTTG e HSP72 senso-AGGCCAACAAGATCACCATC e antisenso-TAGGACTCGAGCGCATTCTT.

4.5.12 Conteúdo de umidade e lipídios das fezes

O conteúdo de umidade nas fezes, coletadas ao fim do experimento, foi determinado pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C, durante 24 horas (AOAC, 2016). A quantificação de lipídios foi realizada por extração em aparelho de Soxhlet, utilizando éter etílico como extrator, por 8 horas, sob refluxo (AOAC, 2016).

4.6 Análise estatística

As análises do artigo 1 foram realizadas em triplicata, composição química, fenólicos totais e capacidade antioxidante, e em duplicata, fibra alimentar e amido resistente, e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Para avaliar a interação entre os genótipos e o tempo de armazenamento (feijão*tempo) foi aplicada a análise de variância ANOVA. Aplicou-se o teste t para avaliar o comportamento de cada cultivar após seis meses de armazenamento. Para comparação entre os genótipos contrastantes submetidos ao armazenamento utilizou-se ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. As análises dos dados foram realizadas nos softwares *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., NC), versão 9.2, e *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA), versão 6.0.

Os dados do ensaio biológico foram plotados no gráfico de dispersão *scatter plot* para a identificação dos *outliers* e os dados fora da distribuição foram eliminados. Após a exclusão dos *outliers*, o número inicial de 12 animais foi reduzido para oito, número mínimo de animais ($n = 8$) por grupo indicados no cálculo amostral do ensaio biológico (IC = 0,95). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi aplicada a análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para as variáveis paramétricas e Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para as variáveis não-paramétricas. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%. Todas as análises do ensaio biológico foram realizadas no software *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA), versão 6.0.

5 ARTIGO 1

ARMAZENAMENTO POR SEIS MESES AUMENTA O CONTEÚDO DE AMIDO RESISTENTE E REDUZ A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.) DE LENTO E RÁPIDO ESCURECIMENTO

RESUMO

Existem evidências de que período de armazenamento de grãos afete a qualidade de feijões do gênero *Phaseolus vulgaris* L., mas pouco é relatado quanto aos efeitos sobre as características nutricionais de genótipos de feijão carioca. O objetivo do estudo foi determinar o efeito do armazenamento comercial (seis meses) sobre a composição química de genótipos de lento escurecimento (LE) e de rápido escurecimento (RE). As análises foram realizadas nas farinhas de feijão cru obtidas após a colheita (tempo zero) e após o armazenamento por seis meses à temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), sem controle de umidade relativa do ar. Foram avaliados os genótipos Pinto Bean-PB (controle/LE), BRSMG Madrepérola-MP e CNFC 10467-CN (LE) e BRS Estilo-ES e BRS Pontal-PO (RE). Como esperado, observou-se que o escurecimento do tegumento dos genótipos RE após o armazenamento foi mais intenso quando comparado aos feijões de LE. Os aminoácidos limitantes de todos os genótipos foram: valina, metionina e cisteína. O armazenamento por seis meses promoveu aumento ($p < 0,05$) de 10,9% a 36,0% da concentração de amido resistente e redução ($p < 0,05$) de 23,5% a 36,7% da capacidade antioxidante nos genótipos avaliados. As concentrações de umidade e de compostos fenólicos nos feijões MP e PB foram aumentadas (10,1% para umidade e 40,5% para fenólicos) ($p < 0,05$), e reduzidas nos genótipos CN, ES e PO (10,1% para umidade e 20,1% para fenólicos) ($p < 0,05$) após seis meses de armazenamento. Conclui-se que o armazenamento por seis meses aumenta o conteúdo de amido resistente e reduz a capacidade antioxidante dos genótipos de feijão carioca independente das características de resistência ou propensão ao escurecimento dos grãos.

Palavras-chave: amido resistente, capacidade antioxidante, armazenamento, feijão carioca

5.1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais consumidas e importantes no mundo (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015). O cultivo do feijoeiro é difundido em quase todos os países de clima tropical e subtropical por sua capacidade de adaptação edafoclimática. Além disso, a importância dessa leguminosa na alimentação humana fundamenta-se na sua elevada aceitabilidade entre as diferentes culturas e por ser uma excelente fonte de proteínas, carboidratos, fibra alimentar, amido, compostos fenólicos, vitaminas e minerais (THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003; RESENDE et al., 2008; MARTINO et al., 2012).

O Brasil produz e consome cerca de 3,1 milhões de toneladas anuais de feijão. Esta quantidade representa participação de mais de 90% na produção e consumo dessa leguminosa dentre os países do Mercosul (CONAB, 2015). O consumo médio de feijão cozido da população brasileira é de 182,9 g/dia (POF, 2010). O feijão tipo carioca é a variedade mais cultivada e consumida no País, representando 52% da área cultivada de feijão no Brasil e respondendo por 69,2% do volume produzido dessa leguminosa na safra de 2014/2015 (CONAB, 2015; BRASIL, 2015a).

O escurecimento dos grãos após a colheita e durante o armazenamento, principalmente em condições inadequadas de umidade e temperatura, é irreversível e influencia negativamente a aceitação comercial dos feijões, principalmente nos cultivares de tegumento claro como o carioca (BRAGANTINI, 2005). Essa modificação fisiológica e bioquímica promove a perda da qualidade do produto, onerando os custos para os agricultores (BRAGANTINI, 2005; TEIXEIRA; SIQUEIRA; BASSINELLO, 2011). Com o objetivo de evitar perdas agronômicas e suprir as necessidades do mercado brasileiro por novos cultivares, os feijões BRSMG Madrepérola, Milênio, Alvorada, Requite e ANFC9 foram desenvolvidos em pesquisas de melhoramento genético com características de resistência ao processo de escurecimento dos grãos (FARIA et al., 2004; CARNEIRO et al., 2012; CONAB, 2015).

A qualidade comercial e a aceitabilidade pelos consumidores de um novo cultivar de feijão são definidas por aspectos comerciais como cor, brilho, forma e tamanho do grão, e por características culinárias como sabor, textura, tempo de cocção e também pela qualidade nutricional (BASSINELLO et al., 2003). A coloração dos grãos

é o principal atributo que influencia o consumidor na compra e na aceitabilidade dos feijões. Durante o armazenamento, a coloração do tegumento dos feijões tende a escurecer, e o consumidor associa esse fenômeno ao envelhecimento e endurecimento do produto (TEIXEIRA; SIQUEIRA; BASSINELLO, 2011).

Os defeitos texturais conhecidos como *hardshell* (casca dura) e *hard-to-cook* (HTC) (difícil-de-cozinhar) são tipos de deterioração que ocorrem nos feijões durante o seu armazenamento sob umidade e temperatura elevadas. No primeiro fenômeno a casca torna-se impermeável a água devido o endurecimento dessa estrutura, enquanto que no HTC ocorre o endurecimento dos cotilédones e alterações de aderência entre as células do grão. A menor aceitabilidade do feijão pelo consumidor resultará da aplicação de um maior tempo de cocção da leguminosa para amaciamento de suas estruturas, que implicará na perda de textura e sabor dos grãos, e ainda redução do valor nutricional do feijão (GARCIA et al., 1998; REYES-MORENO; PAREDES-LÓPEZ; GONZALEZ, 1993; SCHOENINGER, 2013).

Evidências quanto à influência do armazenamento sob a composição química e nutricional de feijões do tipo carioca e a caracterização de novos cultivares e de linhagens de feijões desta variedade são escassas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição química de genótipos contrastantes para o processo de escurecimento dos grãos após a colheita (tempo zero) e investigar o efeito do armazenamento comercial por seis meses sobre esse conteúdo químico e de compostos bioativos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Amostras

Os genótipos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto Bean (PB), feijão canadense semelhante em coloração ao grupo carioca, BRSMG Madrepérola (MP), CNFC 10467 (CN), BRS Estilo (ES) e BRS Pontal (PO), feijões tipo comercial carioca, foram cedidos pela EMBRAPA Arroz e Feijão. O PB, feijão tipo exportação, difere morfológicamente dos feijões do grupo comercial carioca por apresentar pontuações (“pintas”) marrons escuras nos seus grãos, enquanto que os feijões do tipo carioca possuem listras marrons escuras (MARLES; VANDENBERG; BETT, 2008;

EMBRAPA, 2017). Os genótipos MP, CN, ES e PO foram obtidos do Programa de Melhoramento Genético de Feijoeiro da EMBRAPA Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil e a linhagem PB 1533-15 proveniente do Canadá (University of Saskatchewan) foi fornecida pelo Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão. Os feijões de tegumento de fundo claro usados na presente pesquisa são contrastantes para o processo de escurecimento dos grãos, sendo o PB uma linhagem (1533-15) de feijão canadense de lento escurecimento (LE/Controle), MP e CN, respectivamente, cultivar e linhagem de LE e, ES e PO, cultivares de rápido escurecimento (RE) (DEL PELOSO et al., 2003; JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2008; MELO et al., 2011; SILVA et al., 2011; CARNEIRO et al., 2012).

A semeadura dos grãos ocorreu nos dias 26 e 27 de maio de 2014 em sistema de plantio direto, com espaçamento de 0,45 m de linha, 12 sementes por metro, com adubação de base com fosfato monoamônico (MAP) (04-52-00) (200 Kg/ha) e adubação de cobertura com uréia (200 Kg/ha). A colheita dos feijões ocorreu durante os meses de agosto e setembro de 2014, na Fazenda Capivara da EMBRAPA Arroz e Feijão. Após a colheita (tempo zero), limpeza, secagem e expurgo dos grãos com fosfeto de alumínio (Fosfina), as amostras foram quarteadas, separadas em três repetições e armazenadas em câmara fria a temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ por seis meses (180 dias), em sacos de tecido. A umidade relativa do ar não foi controlada durante o armazenamento, apenas monitorada e registrada. Ao fim dos processos de colheita (tempo zero) e armazenamento por seis meses, uma parcela dos grãos crus foram triturados em moinho de martelo (CT 1093 Cyclotec, Foss®, Hillerød, Dinamarca), provido de peneira (500 μm , 35 mesh) e embalados a vácuo. Os grãos restantes e as farinhas dos feijões crus foram enviados ao Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidos sob refrigeração à -18°C até o momento das análises.

5.2.2 Caracterização química e de compostos bioativos

Perfil e escore químico de aminoácidos (EQA)

O perfil de aminoácidos dos genótipos MP e CN (LE) e ES e PO (RE) foi determinado no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro. O efeito do tempo de armazenamento não foi investigado

sobre o perfil de aminoácidos, portanto, somente os feijões no tempo zero foram avaliados. As farinhas de feijão cru foram hidrolisadas e submetidas à reação de derivatização com carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidila (AMQ), com exceção das amostras de triptofano, aminoácido fluorescente. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência no sistema cromatográfico Alliance® Waters 2695 com detectores de fluorescência 2475 e de arranjo de fotodiodos 2996 (PDA), em coluna Nova-Pak® C18. Os cromatogramas foram obtidos a 395 nm, 250 nm e 254 nm (AOAC, 2000; LIU et al., 1995). O escore químico de aminoácidos (EQA) dos feijões foi calculado a partir dos conteúdos de aminoácidos (mg aa/g ptn) e divididos pelos valores padrões dos aminoácidos de referência (FAO/WHO, 2007). As concentrações de proteína das farinhas foram determinadas pelo método de Kjeldahl, utilizando-se fator de conversão de proteína de 6,25 (AOAC, 2016) (Método 960.52).

Composição química

A composição química dos feijões foi avaliada segundo os procedimentos analíticos da *Association of Official Analytical Chemists - AOAC* (2016). A umidade foi determinada pelo método gravimétrico (Método 934.01), cinzas por calcinação (Método 923.03), proteína pelo método de Kjeldahl (aplicando-se o fator de conversão de proteína de 6,25) (Método 960.52) e lipídios por extração em aparelho de Soxhlet (Método 920.39). As concentrações de fibra alimentar total, fração solúvel e insolúvel foram obtidas após hidrólise das amostras com as enzimas α -amilase termorresistente, protease e amiloglicosidase (*Total dietary fiber assay kit*, Sigma®), filtração em cadinhos (ASTM 40-60mesh) com celite, secagem e quantificação dos resíduos não digeridos (AOAC, 2016) (Método 985.29). O conteúdo de carboidratos foi calculado por meio da diferença entre o total da amostra e os conteúdos de proteínas, lipídios, fibra alimentar, umidade e cinzas (AOAC, 2016). O valor energético foi determinado utilizando os fatores de conversão 4, 4 e 9 kcal/g de alimento para carboidratos, proteínas e lipídios, respectivamente (FRARY; JOHNSON, 2005). O conteúdo de amido resistente foi determinado por kit enzimático da Megazyme® baseados nos procedimentos analíticos da AOAC (2016) (Método 2002.02).

Compostos bioativos

Os extratos das amostras foram obtidos por maceração das farinhas de feijão em metanol 60% à temperatura ambiente (BLOOR, 2001). Os compostos fenólicos totais foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A quantificação dos fenólicos totais ocorreu por meio de curva analítica obtida com concentrações de ácido gálico de 0 a 250 µg/mL ($y = 0,0009x - 0,0012$, $R^2 = 0,9965$) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g⁻¹). O conteúdo de flavonoides nas amostras foi determinado de acordo com Zhishen, Mengcheng, e Jianming (1999). Os flavonoides totais foram quantificados por meio de curva analítica de catequina nas concentrações de 0 a 250 µg/mL ($y = 0,0001x + 0,0000$, $R^2 = 0,9925$) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina por grama de amostra (mg EC/g⁻¹). A capacidade antioxidante das farinhas de feijão foi determinada por meio da atividade de retirada de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (BLOIS, 1958), a qual foi calculada segundo a equação: $AAR\% = [(Absorbância\ do\ controle - Absorbância\ da\ amostra) / Absorbância\ do\ controle] \times 100$. As leituras dos resultados foram realizadas em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 726 nm (fenólicos), 510 nm (flavonoides) e a 517 nm (capacidade antioxidante). A capacidade antioxidante das amostras de feijão foi comparada a padrões de ácido ascórbico (AA) e butilhidroxitolueno (BHT) por meio das equações obtidas com concentrações de 3,125 a 100 µg/mL dos respectivos padrões: AA: $y = 14,53\ln(x) + 21,10$, $R^2 = 0,973$; BHT: $y = 25,65\ln(x) - 5,427$, $R^2 = 0,856$ (MOREIRA et al., 2013). O valor de “y” da equação foi substituído pelo percentual de sequestro de DPPH (AAR%) das amostras de feijão e desta forma inferiu-se o teor de substâncias sequestrantes equivalentes a concentrações de AA (µg/mL) e BHT (µg/mL).

5.2.3 Análise estatística

O delineamento experimental do estudo foi realizado em blocos ao acaso, com um esquema fatorial 5x3x2x1, cujos fatores foram: cinco linhagens de feijão (sendo um controle - PB, dois resistentes ao escurecimento - MP e CN, e dois susceptíveis - ES e PO), três repetições, dois períodos de avaliação (após a colheita - tempo zero e 180 dias - seis meses de armazenamento) e uma temperatura (21°C ± 4°C/umidade relativa

71,5%). As linhagens de feijão foram cultivadas simultaneamente, dias 26 e 27 de maio de 2014, constituindo-se cada uma, um bloco e o armazenamento dos feijões foi iniciado logo após a colheita (agosto e setembro de 2014), limpeza, secagem (13% umidade) e expurgo do material.

As análises foram realizadas em triplicata para avaliação da composição química, fenólicos totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante, e em duplicata para fibra alimentar e amido resistente. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Utilizou-se a análise de variância ANOVA para avaliação da interação entre os genótipos e o tempo de armazenamento (feijão*tempo). Aplicou-se o teste t para avaliar o comportamento de cada cultivar após seis meses de armazenamento. Para comparação entre os genótipos contrastantes submetidos ao armazenamento utilizou-se ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. As análises dos dados foram realizadas nos softwares *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., NC), versão 9.2, e *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA), versão 6.0.

5.3 RESULTADOS

Perfil e escore químico de aminoácidos (EQA)

Os aminoácidos em maiores quantidades nos genótipos de feijão carioca foram leucina (1,05 a 1,54 g), lisina (0,85 a 1,38 g), fenilalanina (0,77 a 1,11 g), asparagina (1,56 a 2,20 g) e glutamina (2,04 a 2,86) (Tabela 2). Todos os genótipos de feijão carioca avaliados apresentaram no mínimo 2 aminoácidos essenciais com EQA menor que 1,0 (Tabela 3). BRSMG Madrepérola (MP) e CNFC 10467 (CN), genótipos de lento escurecimento (LE), apresentaram de 4 a 6 aminoácidos limitantes, enquanto que para os feijões de rápido escurecimento (RE), BRS Estilo (ES) e BRS Pontal (PO), esse número variou de 2 a 6. Entre os aminoácidos essenciais, a valina e os aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína, foram limitantes nos quatro genótipos, sendo a valina o primeiro aminoácido limitante no genótipo MP e metionina e cisteína nos demais cultivares. Outros aminoácidos limitantes foram a histidina e lisina (MP e ES), isoleucina e leucina (MP, CN e ES).

Tabela 2. Perfil de aminoácidos (g/100 g) de genótipos de feijão do tipo carioca após a colheita (tempo zero) à temperatura 21°C.

| GENÓTIPOS | LE | | RE | |
|------------------------------------|-------------------|------------|------------|------------|
| | BRSMG Madrepérola | CNFC 10467 | BRS Estilo | BRS Pontal |
| ESSENCIAIS | | | | |
| HIS | 0,37 | 0,56 | 0,34 | 0,54 |
| ILE | 0,52 | 0,72 | 0,51 | 0,76 |
| LEU | 1,08 | 1,46 | 1,05 | 1,54 |
| LYS | 1,01 | 1,37 | 0,85 | 1,38 |
| MET | 0,24 | 0,24 | 0,25 | 0,23 |
| PHE | 0,79 | 1,11 | 0,77 | 1,10 |
| THR | 0,67 | 0,91 | 0,72 | 0,93 |
| TRP | 0,23 | 0,27 | 0,18 | 0,15 |
| VAL | 0,62 | 0,85 | 0,69 | 0,88 |
| NÃO ESSENCIAIS | | | | |
| ALA | 0,55 | 0,75 | 0,60 | 0,78 |
| ASP | 1,57 | 2,10 | 1,56 | 2,20 |
| SER | 0,85 | 1,21 | 0,93 | 1,21 |
| CONDICIONALMENTE ESSENCIAIS | | | | |
| ARG | 1,03 | 1,45 | 0,78 | 1,55 |
| CYS | 0,15 | 0,12 | 0,16 | 0,16 |
| GLU | 2,04 | 2,79 | 2,11 | 2,86 |
| GLY | 0,51 | 0,71 | 0,56 | 0,82 |
| PRO | 0,52 | 0,74 | 0,45 | 0,73 |
| TYR | 0,46 | 0,65 | 0,51 | 0,64 |

LE: lento escurecimento; RE: rápido escurecimento

Tabela 3. Escore químico de aminoácidos (EQA), segundo a FAO/WHO (2007) de genótipos de feijão do tipo carioca após a colheita (tempo zero) à temperatura 21°C.

| Aminoácidos essenciais | BRSMG Madrepérola | | CNFC 10467 | | BRS Estilo | | BRS Pontal | | FAO/WHO 2007 |
|------------------------|-------------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|--------------|
| | mg aa/g ptn | EQA | mg aa/g ptn | EQA | mg aa/g ptn | EQA | mg aa/g ptn | EQA | |
| Fenilalanina/Tirosina | 50,38 | 1,10 | 72,49 | 1,58 | 53,31 | 1,16 | 74,94 | 1,63 | 46,0 |
| Histidina | 14,91 | 0,83 | 23,06 | 1,28 | 14,16 | 0,79 | 23,26 | 1,29 | 18,0 |
| Isoleucina | 20,96 | 0,68 | 29,65 | 0,96 | 21,24 | 0,69 | 32,73 | 1,06 | 31,0 |
| Leucina | 43,53 | 0,69 | 60,13 | 0,95 | 43,73 | 0,69 | 66,32 | 1,05 | 63,0 |
| Lisina | 40,71 | 0,78 | 56,43 | 1,09 | 35,40 | 0,68 | 59,43 | 1,14 | 52,0 |
| Metionina/Cisteína | 15,72 | 0,60 | 14,83 | 0,57 | 17,08 | 0,66 | 16,80 | 0,65 | 26,0 |
| Treonina | 27,01 | 1,00 | 37,48 | 1,39 | 29,99 | 1,11 | 40,05 | 1,48 | 27,0 |
| Valina | 24,99 | 0,59 | 35,01 | 0,83 | 28,74 | 0,68 | 37,90 | 0,90 | 42,0 |

*Interações cultivares de feijão*tempo*

O feijão PB, genótipo controle e de LE, foi único genótipo que não apresentou modificações na cor do tegumento após seis meses de armazenamento. Os demais genótipos de feijão carioca contrastantes quanto ao processo de escurecimento durante o armazenamento, MP e CN (LE) e ES e PO (RE), apresentaram alteração visual de coloração com seis meses de armazenamento (Figura 3).

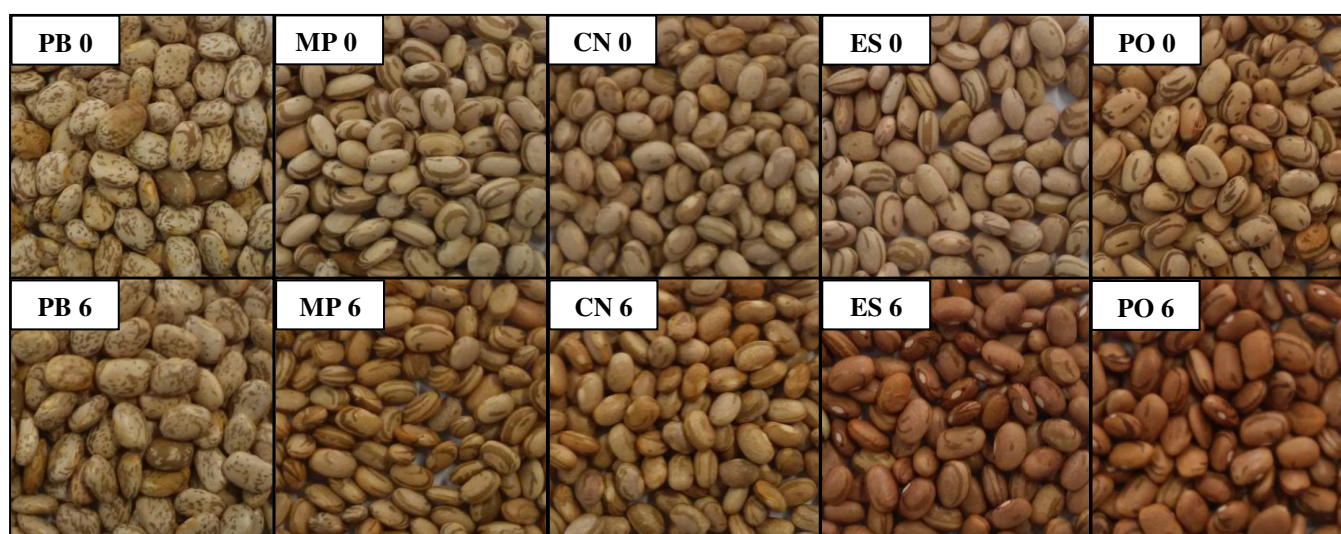


Figura 3. Genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero (linha superior) e armazenados por seis meses (linha inferior).

Pinto Beans - PB (Controle), BRSMG Madrepérola - MP e CNFC 10467 - CN (LE), BRS Estilo - ES e BRS Pontal - PO (RE).

A interação genótipo*tempo (Figura 4) foi observada para o conteúdo de amido resistente ($p= 0,004$) e para a capacidade antioxidante ($p= 0,016$). O armazenamento por seis meses promoveu o aumento de 10,9% a 36,0% da concentração de amido resistente nos genótipos PB, MP, CN, ES e PO. Em relação a capacidade antioxidante, observou-se que o armazenamento teve efeito de reduzir de 23,5% a 36,7% a atividade de retirada de radical nos genótipos avaliados. A análise de interação é conclusiva quanto ao efeito do armazenamento sobre os componentes investigados nos feijões, portanto, pode-se concluir que o amido resistente aumentou e a capacidade antioxidante reduziu significativamente nos genótipos de feijão cru após seis meses de armazenamento, independente se são mais ou menos propensos ao escurecimento dos grãos.

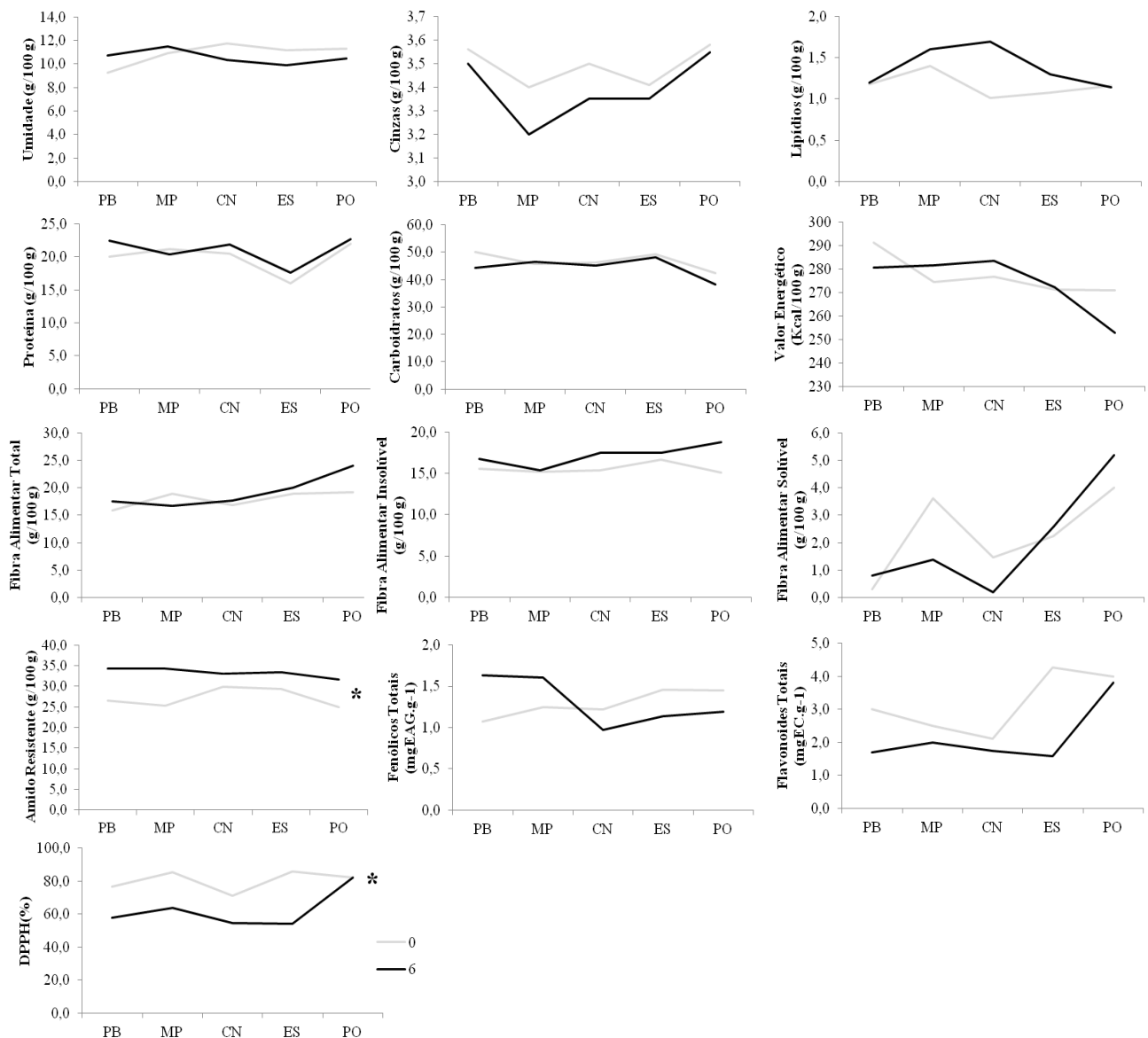


Figura 4. Interação cultivares de feijão*tempo para a composição química e conteúdo de compostos bioativos dos genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero e armazenados por seis meses. Pinto Beans - PB (Controle), BRSMG Madrepérola - MP e CNFC 10467 - CN (LE), BRS Estilo - ES e BRS Pontal - PO (RE). *Diferença estatística a 5% de probabilidade pela análise de variância ANOVA.

Efeito do armazenamento por seis meses na composição química dos genótipos

O armazenamento por seis meses modificou as características químicas dos genótipos de feijão carioca, independente das características dos genótipos de resistência ou propensão ao escurecimento dos grãos (LE ou RE) (Figura 5). Observou-se que o armazenamento aumentou ($p < 0,05$) a umidade do feijão controle PB (15,5%) e do genótipo de LE, MD (4,8%), e reduziu ($p < 0,05$) esse conteúdo no feijão de LE, CN (1,4%), e nos genótipos de RE, ES (1,2%) e PO (0,8%) (Figura 5A). As concentrações de umidade do CN e do ES após o armazenamento foram menores ($p < 0,05$) em comparação ao feijão controle (PB) (Figura 5A).

O armazenamento reduziu ($p < 0,05$), aproximadamente 5,0%, as concentrações de cinzas dos feijões MP e CN (LE) e em relação ao controle, o MP apresentou o menor conteúdo de cinzas no tempo de seis meses de armazenamento (Figura 5B). As concentrações de lipídios foram aumentadas ($p < 0,05$) pelo armazenamento no MP e CN (LE) e no ES (RE), respectivamente, 14,2%, 68,3% e 20,3% (Figura 5C). No tempo de seis meses, os genótipos de LE apresentaram conteúdo de lipídios maiores ($p < 0,06$) comparados ao PB (Figura 5C).

Houve aumento ($p < 0,05$) das concentrações de proteínas no feijão PB (controle) e CN (6,8% e 12,5%) e redução ($p < 0,05$) de carboidratos no controle e nos genótipos ES e PO (RE), respectivamente, de 11,5%, 2,0% e 10,1%, como resultados do efeito do tempo de armazenamento por seis meses na composição química (Figura 5D e 5E). O CN apresentou conteúdo de proteína semelhante ($p > 0,05$) ao PB e as concentrações de carboidratos foram maiores ($p < 0,05$) no ES em relação ao controle no tempo seis de armazenamento (Figura 5D e 5E).

O armazenamento comercial por seis meses promoveu a redução ($p < 0,05$) do conteúdo energético em 5,1% nos feijões PB e PO e o aumento ($p < 0,05$) em 2,5% do conteúdo calórico dos genótipos de LE (MP e CN) (Figura 5F). No entanto, o valor energético não diferiu ($p > 0,05$) entre o controle e os genótipos de LE no tempo seis de armazenamento (Figura 5F).

O tempo de armazenamento de seis meses não afetou ($p > 0,05$) as concentrações de fibra alimentar insolúvel (Figura 5H), porém reduziu ($p < 0,05$) 11,3% e 62,0%, respectivamente, os conteúdos de fibra alimentar total e da fração solúvel no genótipo

de LE, MP (Figura 5G e 5I). Os conteúdos de fibra alimentar total e de fibra insolúvel (Figura 3G e 3H) foram semelhantes ($p > 0,05$) para todos os genótipos, no entanto, as concentrações de fibra solúvel foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no PO quando comparados ao PB (Figura 5I).

A avaliação do efeito do armazenamento sobre o conteúdo de amido resistente do feijão PB, demonstrou que seis meses de armazenamento não alteraram as concentrações desse componente no genótipo controle (Figura 5J). No entanto, para os demais genótipos de LE e de RE, observa-se que o armazenamento aumentou ($p < 0,05$) aproximadamente 22,0% o conteúdo de amido resistente nos genótipos (Figura 5J). Esse resultado corrobora com a análise de interação genótipo*tempo, que tem por objetivo demonstrar o efeito principal do armazenamento na composição química dos genótipos (Figura 4). O genótipo PO apresentou menor conteúdo de amido resistente no tempo seis meses em relação ao controle PB (Figura 5J).

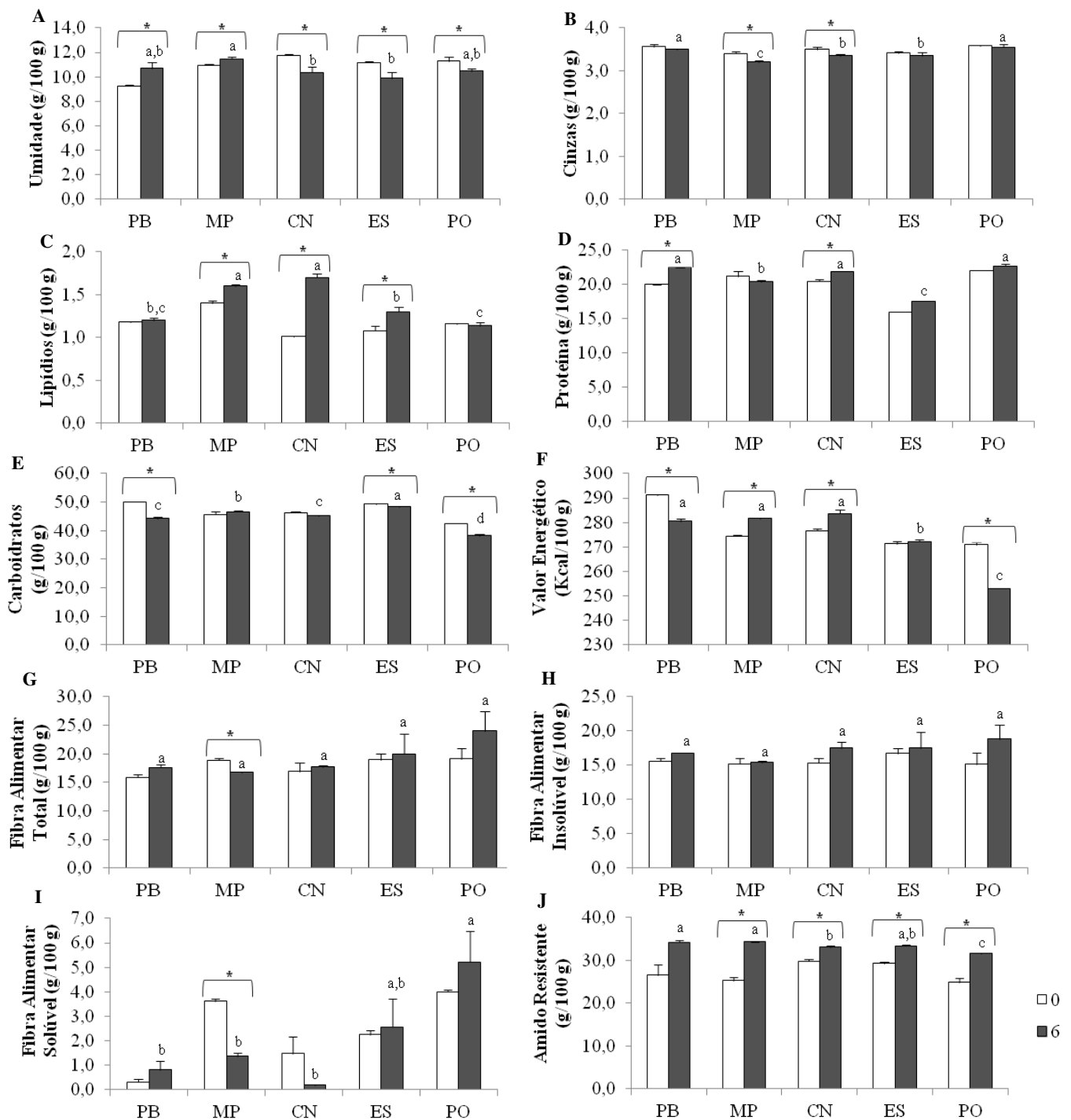


Figura 5. Composição química dos genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero e armazenados por seis meses.

Pinto Beans - PB (Controle), BRSMG Madrepérola - MP e CNFC 10467 - CN (LE), BRS Estilo - ES e BRS Pontal - PO (RE). Valores expressos em média \pm DP (n = 3, 2). *Diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste t entre o conteúdo no tempo zero e após seis meses de armazenamento para cada genótipo. Letras diferentes indicam diferença estatística a 5% de probabilidade pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey, entre os genótipos armazenados por seis meses.

Efeito do armazenamento por seis meses no conteúdo de compostos bioativos dos genótipos

O armazenamento aumentou ($p < 0,05$) em 28,8 e 52,3% o conteúdo de compostos fenólicos, respectivamente, no genótipo PB (controle) e no MP (LE) e reduziu ($p < 0,05$) em média 20,1% as concentrações destes compostos no CN (LE), ES e PO (RE) (Figura 6A). As concentrações de compostos fenólicos foram similares ($p > 0,05$) no MP e PB no tempo seis de armazenamento, e menores no CN (LE) em relação ao genótipo controle (Figura 6A).

As concentrações de flavonoides também foram influenciadas pelo armazenamento por seis meses, pois observou-se reduções ($p < 0,05$) desses compostos de 43,3% no PB (controle), 20,0% no MP (LE) e de 63,2% no ES (RE) (Figura 6B). O maior conteúdo de fenólicos foi apresentada pelo PO, genótipo de RE, em relação ao controle e demais feijões avaliados (Figura 6B).

Em relação à capacidade antioxidante, o armazenamento promoveu a redução da atividade de retirada de radical ($p < 0,05$) para todos os genótipos (controle, LE e RE), exceto para o BRS Pontal (Figura 6C). Os percentuais de DPPH reduziram em 24,4%, 25,3%, 23,5% e 36,7%, respectivamente, no PB, MP, CN e ES. Os resultados observados individualmente nos feijões corroboram com a análise de interação genótipo*tempo, demonstrando que o efeito principal do armazenamento na composição química dos genótipos de redução da capacidade antioxidante dos feijões (Figura 4). O PO apresentou a maior capacidade antioxidante comparado ao controle e demais genótipos no tempo de seis meses (Figura 6C).

As concentrações de substâncias sequestrantes equivalentes aos padrões antioxidantes de AA e BHT nas amostras, estimados com base no DPPH%, foram qualitativamente menores para os genótipos com seis meses de armazenamento, pois observou-se que o armazenamento reduziu a capacidade antioxidante dos feijões avaliados. Os conteúdos equivalentes a AA e ao BHT foi estimado em maiores concentrações no genótipo ES no tempo zero, respectivamente, 3,56 $\mu\text{g/mL}$ e 4,45 $\mu\text{g/mL}$, e as menores equivalências foram estimadas para os feijões CN e ES no tempo seis, 2,33 $\mu\text{g/mL}$ de AA e aproximadamente 2,30 $\mu\text{g/mL}$ de BHT (Tabela 4).

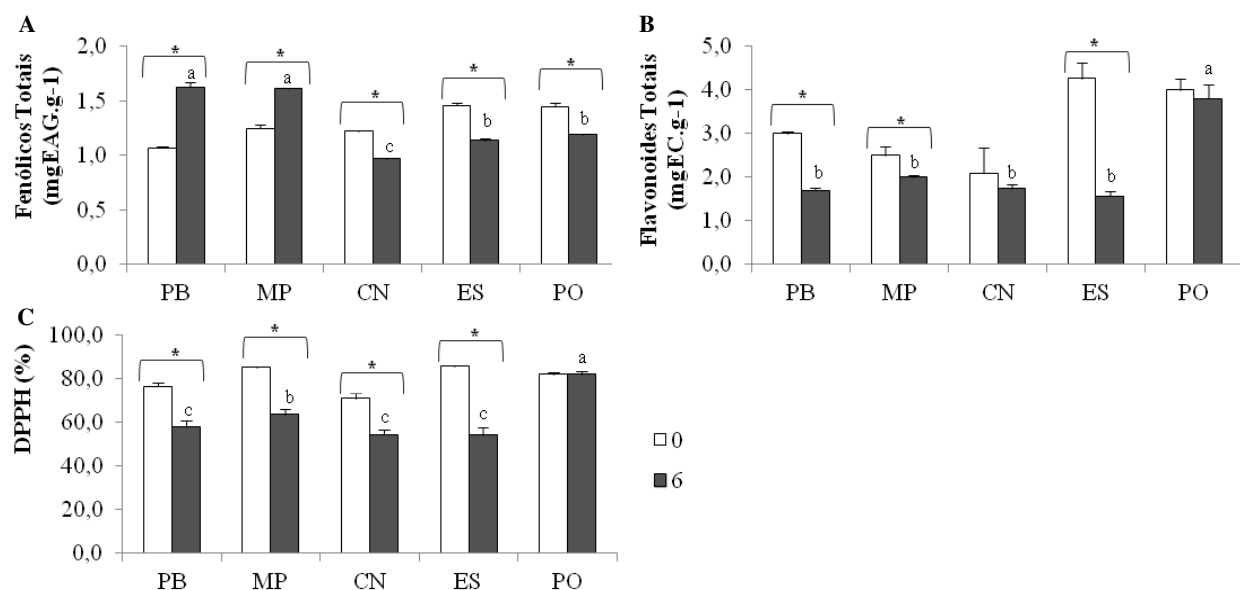


Figura 6. Conteúdos de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B) e atividade antioxidante (atividade de retirada de radical DPPH) (C) dos genótipos de feijão carioca contrastantes para escurecimento no tempo zero e armazenados por seis meses.

Pinto Beans - PB (Controle), BRSMG Madrepérola - MP e CNFC 10467 - CN (LE), BRS Estilo - ES e BRS Pontal - PO (RE). Valores expressos em média \pm DP (n = 3, 2). *Diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste t entre o conteúdo no tempo zero e após seis meses de armazenamento para cada genótipo. Letras diferentes indicam diferença estatística a 5% de probabilidade pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey, entre os genótipos armazenados por seis meses.

Tabela 4. Conteúdo de substâncias sequestrantes de radical (DPPH) equivalente a concentrações de ácido ascórbico (AA) e butilhidroxitolueno (BHT) nos extratos metanólicos dos genótipos de feijão do tipo carioca no tempo zero e armazenados por seis meses à temperatura 21°C.

| Genótipos | AA | BHT |
|--------------|------------------|------------------|
| | $\mu\text{g/mL}$ | $\mu\text{g/mL}$ |
| PB T0 | 3,20 \pm 0,06 | 3,82 \pm 0,10 |
| PB T6 | 2,47 \pm 0,11 | 2,54 \pm 0,19 |
| MP T0 | 3,54 \pm 0,02 | 4,42 \pm 0,04 |
| MP T6 | 2,70 \pm 0,09 | 2,94 \pm 0,15 |
| CN T0 | 2,99 \pm 0,10 | 3,45 \pm 0,18 |
| CN T6 | 2,33 \pm 0,09 | 2,31 \pm 0,16 |
| ES T0 | 3,56 \pm 0,02 | 4,45 \pm 0,03 |
| ES T6 | 2,33 \pm 0,14 | 2,29 \pm 0,24 |
| PO T0 | 3,42 \pm 0,04 | 4,20 \pm 0,06 |
| PO T6 | 3,41 \pm 0,06 | 4,19 \pm 0,10 |

Pinto Bean - PB, BRSMG Madrepérola - MP, CNFC 10467 - CN, BRS Estilo - ES, BRS Pontal - PO, T0 - tempo zero, T6 - armazenamento por 6 meses.

5.4 DISCUSSÃO

O armazenamento a longo prazo de grãos de feijão e outras leguminosas sob temperaturas e umidade elevadas resulta em modificações da estrutura das sementes, desenvolvimento de defeitos texturais como *hardshell* e *hard-to-cook* e em perdas de nutrientes (SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011; SCHOENINGER et al., 2013). Entretanto, são escassos os estudos que avaliam o efeito do armazenamento a curto prazo sobre a composição química dos grãos crus de diferentes genótipos de feijão carioca. O presente estudo investigou a influência do armazenamento por seis meses no conteúdo químico e de compostos bioativos de cinco genótipos de feijão carioca de lento e rápido escurecimento dos grãos.

Os genótipos de feijão carioca apresentaram todos os aminoácidos essenciais e os condicionalmente essenciais, e três aminoácidos dispensáveis. Esta leguminosa é considerada uma excelente fonte de proteína de origem vegetal, pois contém todos os aminoácidos essenciais, com destaque para o conteúdo elevado de lisina (REYES-BASTIDAS et al., 2010; MARTINO et al., 2012; JAFARI et al., 2016), que nos feijões investigados foi de 0,85 g a 1,38 g/100 g. Entretanto, quando comparadas aos padrões de referência (FAO/WHO, 1991, 2007), as proteínas dos genótipos avaliados não são de alto valor nutricional (EQA<1,0), pois a valina, metionina e cisteína foram os principais aminoácidos essenciais limitantes nos quatro tipos de feijão. Portanto, os genótipos de feijão carioca avaliados não suprem as necessidades nutricionais de aminoácidos essenciais do organismo humano (BLANCO; BRESSANI, 1991), sendo necessárias combinações dessa leguminosa com cereais ricos em aminoácidos sulfurados ou o desenvolvimento de novos cultivares de feijão com conteúdo adequado destes aminoácidos essenciais (MARTINO et al., 2012).

O feijoeiro é uma importante fonte de amido resistente do tipo II, amido cru de espécies vegetais (KUTOŠ et al., 2003; LESZCZYNSKI, 2004). As concentrações deste componente nos genótipos crus com e sem armazenamento (tempo zero e seis meses) do presente estudo foram de 24,8 g a 34,3 g/100 g. Esses resultados foram semelhantes a outras pesquisas com feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) sem acondicionamento (CHUNG et al., 2008; EYARU; SHRESTHA; ARCOT, 2009; PEDROSA et al., 2015). Ao comparar com outras leguminosas cruas (ervilha, grão-de-bico e lentilha) (DE

ALMEIDA COSTA et al., 2006), o conteúdo de amido resistente foi 90,0% maior nos genótipos de feijão carioca investigados no nosso estudo.

O armazenamento por seis meses promoveu o aumento de 10,9% a 36,0% ($p < 0,05$) das concentrações de amido resistente nos genótipos de feijão, independente das características de lento ou rápido escurecimento dos grãos. Em produtos de milho armazenados por cinco a dez dias sob refrigeração (5°C) (GARCÍA-ROSAS et al., 2009) e em diferentes cultivares de feijão do tipo carioca cozidos armazenados por quatro dias (4°C) e por 28 dias (-20°C) (PROLLA et al., 2010), também ocorreu esse fenômeno de aumento das concentrações de amido resistente observado nos genótipos contrastantes (LE e RE) com seis meses de armazenamento. Provavelmente esses resultados se devem à retrogradação da amilose, mecanismo de formação do amido resistente do tipo III durante o processamento e a estocagem de alimentos (OZTURK; KOKSEL; PERRY, 2009; CHOU et al., 2010; NUNES et al., 2016).

O aumento da concentração de amido resistente é benéfico, pois a sua fermentação no colón pode gerar ácidos graxos de cadeia curta que podem ser metabolizados pelos colonócitos ou absorvidos para o sistema sanguíneo portal até o fígado, podendo alterar precursores metabólicos envolvidos no metabolismo de lipídios (TOPPING; CLIFTON, 2001; BLOEMEN et al., 2009; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015).

Os genótipos de feijão carioca no tempo zero e armazenados por seis meses apresentaram composição química (g/100 g) de aproximadamente 11,0% de umidade, 3,5% de cinzas, 22,0% de proteína, 1,7% de lipídios, 50,0% de carboidratos, 24,0% de fibra alimentar total, 18,0% de fibra insolúvel, 5,2% de fibra solúvel e conteúdo energético de 291,0 Kcal. Este perfil foi semelhante aos achados na literatura para feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo carioca crus (PROLLA et al., 2010; TACO, 2011; MARTINO et al., 2012).

O cultivar de feijão BRSMG Madrepérola (MP) foi desenvolvido em pesquisas de melhoramento genético com a característica de resistência aos processos de escurecimento dos grãos (CONAB, 2015). O efeito do armazenamento por seis meses sobre a composição química e de compostos bioativos nos genótipos contrastantes (LE

e RE) foi distinto, independente das características de resistência ou propensão ao escurecimento dos grãos.

O armazenamento promoveu o aumento das concentrações de umidade nos genótipos controle Pinto Bean (PB) e MP (LE) e redução desse conteúdo nos feijões CN (LE) e BRS Estilo (ES) (RE). No entanto, nenhuma destes efeitos implicaria no desenvolvimento dos defeitos texturais dos grãos (*hardshell* e *hard-to-cook*), pois os genótipos apresentaram baixa concentração de umidade (<16%), resultando em menor dureza dos grãos durante o armazenamento (RANI et al., 2013).

O armazenamento por seis meses reduziu o conteúdo de fibra alimentar total e de fibra solúvel no MP. A redução da extração e da solubilidade de pectina é observada nos feijões quando estes são armazenados sob temperatura e umidade elevada (45°C, 83% UR) e está relacionado aos defeitos texturais *hardshell* e *hard-to-cook* (LIU; BOURNE, 1995; REYES-MORENO; PAREDES-LÓPEZ; GONZALEZ, 1993; SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011; NJOROGÉ et al., 2015, 2016). No entanto, esse mecanismo não explica os resultados observados no presente estudo, pois o armazenamento dos nossos genótipos ocorreu a temperatura ambiente (21°C ± 4°C). O efeito do armazenamento no conteúdo de fibra alimentar total e na fração solúvel, no entanto, não altera a qualidade nutricional do feijão MP, pois os conteúdos desses nutrientes são semelhantes aos reportados na literatura (PROLLA et al., 2010; TACO, 2011; MARTINO et al., 2012).

O armazenamento por seis meses não resultou na degradação dos conteúdos de proteína e lipídios nos genótipos de feijão investigados. A desnaturação de proteínas e a oxidação de lipídios, ocasionadas por condições de umidade e temperatura elevadas durante o armazenamento dos grãos, provocam os defeitos texturais *hardshell* e *hard-to-cook*, resultando na perda da qualidade e aceitabilidade dos feijões (LIU; BOURNE, 1995; REYES-MORENO; PAREDES-LÓPEZ; GONZALEZ, 1993; SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011; NJOROGÉ et al., 2015, 2016). Portanto, as condições de armazenamento utilizadas no presente estudo foram adequadas para prevenir essas alterações.

Não foram encontrados mecanismos na literatura que justifiquem a redução do conteúdo de cinzas e aumento das concentrações de lipídios e proteína nos genótipos de

feijão carioca após o curto período de armazenamento da presente investigação. No entanto, essas alterações não representam prejuízo na composição nutricional dos feijões, uma vez que a composição química de todos os genótipos encontram-se dentro dos intervalos reportados para grãos de feijão tipo carioca (PROLLA et al., 2010; TACO, 2011; MARTINO et al., 2012; PEDROSA et al., 2015).

A redução de carboidratos nos feijões controle (PB), ES e PO promovida pelo armazenamento por seis meses pode ser explicada pelo mecanismo fisiológico das sementes em degradar açúcares solúveis de reserva, como a rafinose e a sacarose e durante a germinação quando ocorre aceleração da taxa de fermentação anaeróbica nas sementes (FERREIRA et al., 2009; VERONESI et al., 2014).

O menor conteúdo de carboidratos reduziu o valor energético dos feijões PB (controle) e PO (RE) armazenados. Enquanto que para os genótipos MP e CN (LE), o conteúdo calórico foi aproximadamente 2,5% maior com seis meses de armazenamento em função do maior conteúdo de lipídios expresso por esses feijões e, conseqüentemente, maior contribuição calórica deste macronutriente (9 kcal/g) (FRARY; JOHNSON, 2005).

O armazenamento por seis meses resultou em alterações de coloração dos grãos em todos os genótipos de feijão carioca investigados, exceto para o feijão Pinto Bean (PB) (controle). Resultado semelhante foi observado em armazenamento superior, por oito meses (SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011). Essas modificações, avaliadas visualmente, foram mais intensas para os genótipos de RE, pois BRS Estilo (ES) e BRS Pontal (PO) apresentaram tegumentos de tonalidade mais escura com seis meses de armazenamento comparados ao MP e CN, feijões de LE. Os genótipos de RE apresentam, portanto, maior possibilidade de manifestarem os defeitos texturais *hardshell* e *hard-to-cook* após seis meses de armazenamento, devido a coloração mais escura dos grãos (STANLEY; AGUILERA, 1985; SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011).

Os compostos fenólicos são os fitoquímicos mais relevantes no feijão, por desempenharem capacidade antioxidante, antimutagênicas e anticarcinogênica (CAMPOS-VEGA et al., 2013; LUNA-VITAL et al., 2015; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015) e são determinantes da pigmentação do tegumento das sementes em grãos

(BENINGER; HOSFIELD, 1999; CARDADOR-MARTÍNEZ; LOARCA-PIÑA; OOMAH, 2002). As concentrações desses compostos bioativos no genótipo controle e nos genótipos de feijão carioca de LE e RE no tempo zero e com seis meses de armazenamento foram de 1,0 a 1,6 mg EAG.g⁻¹. Estes valores são inferiores aos resultados observados para o BRS Pontal e para outros genótipos de feijão carioca (BRS-Horizonte e Pérola) (MOJICA et al., 2015).

A redução do conteúdo de fenólicos totais após o armazenamento observada para os feijões de LE (CN) e de RE (ES e PO) pode ter ocorrido em função da oxidação desses compostos por enzimas como as oxido-redutases, o que resultou em perdas e na produção de compostos que modificam a cor dos grãos (MARLES; VANDENBERG; BETT, 2008; VANIER et al., 2014). A lignificação dos compostos fenólicos com proteínas de reticulação do grão ou com outras macromoléculas também pode estar relacionada as reduções dos compostos bioativos nos feijões, pois esse mecanismo resulta em menor extração dos compostos e, conseqüentemente, na redução da quantidade de substrato que reage com o Folin-Ciocalteu, subestimando o conteúdo de compostos fenólicos (STANLEY; AGUILERA, 1985; SHIGA; CORDENUNSI; LAJOLO, 2011; VANIER et al., 2014). No entanto, o efeito do armazenamento observado para os genótipos CN, ES e PO são vantajosos, pois em decorrência das menores concentrações de fenólicos estes genótipos apresentam menor probabilidade de modificações texturais em seus grãos. Os mecanismos citados para as reduções de fenólicos totais também justificam as perdas ($p < 0,05$), de 20,0% a 63,2%, de flavonoides totais nos feijões MP (LE), PB (controle) e ES (RE), após o período de armazenamento.

A capacidade antioxidante dos feijões no tempo zero e com seis meses de armazenamento foi de 54,3% a 85,8%, capacidade aproximadamente 50% maior comparado aos achados na literatura (CARDADOR-MARTÍNEZ; LOARCA-PIÑA; OOMAH, 2002). O armazenamento promoveu a redução (23,5% a 36,7%) da atividade de retirada de radical ($p < 0,05$) para os genótipos MP e CN (LE), PB (controle) e ES (RE), provavelmente em função da redução de compostos do feijão com capacidade antioxidante como o ácido fítico, compostos fenólicos e saponinas (MARTINO et al., 2012) ou devido à dificuldade de extração desses compostos (VANIER et al., 2014).

5.5 CONCLUSÃO

Os efeitos do armazenamento por seis meses sobre composição química e nutricional dos genótipos de feijão cru não foram influenciados pelas características de resistência ou propensão ao escurecimento dos grãos. Esses resultados demonstram que o armazenamento por até seis meses, em temperatura ambiente, influenciou positivamente o conteúdo de amido resistente nos feijões avaliados, melhorando a qualidade nutricional dessa leguminosa. E, embora a capacidade antioxidante tenha reduzido após seis meses de armazenamento, os genótipos avaliados apresentam em média maior capacidade de reduzir os radicais livres em relação a outros feijões.

6 ARTIGO 2

FARINHA INTEGRAL E HIDROLISADO PROTEICO DE FEIJÃO CARIOCA REDUZEM O ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERCOLESTEROLÊMICA

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do consumo da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão sobre o estresse oxidativo e a inflamação em camundongos BALB/c alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica (HFCD). A farinha integral de feijão cozido (WF) e o hidrolisado proteico de feijão (PH) foram analisados quanto ao conteúdo e perfil de compostos fenólicos. As medidas biométricas, consumo alimentar e bioquímicas foram avaliados em quatro grupos experimentais (n= 12 animais): controle normal (AIN-93M), controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico (HFCD), HFCD adicionada de farinha integral de feijão cozido (HFCD-WF) e HFCD e PH (HFCD-PH), durante nove semanas de experimentação. Além disso, foram avaliadas a capacidade antioxidante total (CAT), atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD e catalase), peroxidação lipídica (malondialdeído – MDA), a expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 10 (IL-10), fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB), receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α), SOD e *Heat Shock Proteins 72* (HSP72) e a excreção de umidade e lipídios nas fezes. As concentrações de fenólicos totais foram menores na WF ($140,0 \pm 5,87 \mu\text{g EAG/g}$) e maiores no PH ($1.025,6 \pm 99,14 \mu\text{g EAG/g}$), sendo identificados dois fenólicos (catequina e kaempferol) na WF e apenas o kaempferol no PH. O consumo de PH reduziu ($p < 0,05$) o ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e o coeficiente de eficiência energética (CEE) nos animais, enquanto, a ingestão de WF reduziu ($p < 0,05$) a atividade das enzimas hepáticas (ALT e AST) e aumentou ($p < 0,05$) o conteúdo de umidade e lipídios nas fezes. As intervenções com WF e PH reduziram ($p < 0,05$) a glicemia, o colesterol total, a peroxidação lipídica (MDA) no soro, aumentaram ($p < 0,05$) a atividade de SOD e inibiram a ativação da via inflamatória do NFkB ($p < 0,05$). Os

resultados demonstram que a hidrólise da WF aumentou a quantidade, mas afetou a qualidade de compostos fenólicos do PH e que ambas as intervenções (WF e PH) apresentam efeitos benéficos, sendo capazes de reduzir os riscos para as doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: compostos fenólicos, HSP72, MDA, NFkB, peptídeos bioativos

6.1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbimortalidade em nível mundial. Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram por DCV em 2012, o que representou 31% das mortes em todo o mundo (WHO, 2017). A hipercolesterolemia é o principal fator de risco para o desenvolvimento de DCV (LAMMI et al., 2015; NELSON, 2013). Essa condição é caracterizada pelo desequilíbrio da homeostase de lipídios e elevação de lipoproteínas no plasma, mais comumente, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e triacilglicerídeos, e está associada principalmente à composição da dieta e a inatividade física (STONE et al., 2013).

A exposição prolongada a hipercolesterolemia resulta em alterações na estrutura e função dos vasos sanguíneos (GRANGER et al., 2010) e no acúmulo de lipídios no tecido hepático (WESTERBACKA et al., 2005; ANDRADE et al., 2013; NAIR et al., 2014). Em resposta a disfunção endotelial e a deposição de gordura no fígado, há aumento da peroxidação de lipídios e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KURTEL et al., 2013). O desequilíbrio entre a produção e a utilização das EROs caracteriza o estresse oxidativo (SIES, 1997) e tem por consequências a modificação oxidativa de componentes celulares como os lipídios e as proteínas, danos celulares ou a necrose/apoptose celular (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015). O estresse oxidativo induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), ativa a via inflamatória do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB) (CAI et al., 2005; SU et al., 2015) e essa sinalização produz mais EROs e citocinas inflamatórias, aumentando continuamente o estresse oxidativo e o dano celular (SCHETT et al., 2013). Nesse sentido, a busca por estratégias dietéticas contra a hipercolesterolemia, o estresse oxidativo e o processo inflamatório são de interesse para a prevenção das DCV (WHO, 2017).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais consumidas e importantes no mundo (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015). Os feijões são fonte de proteínas, carboidratos, fibra alimentar, amido, compostos fenólicos, vitaminas e minerais (THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003; MARTINO et al., 2012). As proteínas são o segundo principal componente dessa leguminosa. As concentrações desse nutriente variam de 20-30% nos cultivares de feijão (HAYAT et al., 2014) e seus derivados peptídicos estão relacionados a modulação negativa do processo inflamatório (ALVES et al., 2016ab).

As proteínas do feijão após o processo de digestão, fermentação ou hidrólise enzimática, dão origem a hidrolisados e peptídeos ativos biologicamente (WANG; DE MEJIA, 2005), com importantes funções fisiológicas, como, atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e anti-carcinogênica (LUNA-VITAL et al., 2015; OSEGUERA-TOLEDO et al., 2011; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA et al., 2013; FERREGRINO-PEREZ et al., 2014; PEREIRA; TAVANO, 2014; MOJICA; CHEN; MEJÍA, 2015; MOJICA; MEJÍA, 2015). Alves e colaboradores (2016a) identificaram sequências de peptídeos bioativos (LVTITVDL, QTSTPLFS, TRGVLV e VELVGPK principalmente) no hidrolisado proteico de feijão BRSMG Madrepérola com função antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva e com atividade de inibição da enzima *dipeptidyl peptide protease IV* (DPP-IV). Os peptídeos bioativos do hidrolisado proteico de feijão Madrepérola foram eficazes em reduzir a inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos humanos (macrófagos THP-1), por meio da redução dos marcadores inflamatórios TNF- α , prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina 1- β (IL-1- β) (ALVES et al., 2016a). Esse genótipo de feijão carioca foi utilizado no presente estudo porque o seu armazenamento por seis meses (180 dias) não afetou o seu perfil de proteínas e a sua bioeficácia antioxidante e anti-inflamatória, além disso, o feijão Madrepérola apresentou capacidade antioxidante e número de sequências peptídicas (11 peptídeos) superiores em relação a outro genótipo de feijão carioca (ALVES et al., 2016a).

Diante dessas evidências, espera-se que a ingestão da farinha e do hidrolisado proteico de feijão com peptídeos com função antioxidante sejam capazes de modular negativamente o estresse oxidativo e a inflamação induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica em modelo *in vivo* com camundongos BALB/c.

Portanto, será investigado no presente estudo o efeito da farinha integral de feijão e do hidrolisado proteico no estresse oxidativo e na inflamação.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Amostras

O genótipo de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) BRSMG Madrepérola, tipo Carioca, foi cedido pela EMBRAPA Arroz e Feijão. Esse cultivar foi obtido por meio de pesquisas de melhoramento genético, a partir do cruzamento entre 2 linhagens: AN 512666-0 e AN 730031, para resistir ao escurecimento durante o armazenamento (CARNEIRO et al., 2012). O plantio e a colheita dos grãos foram realizados durante os meses de setembro e outubro de 2013, na Fazenda Capivara da EMBRAPA Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil. Após a colheita, limpeza, secagem e expurgo dos grãos com fosfeto de alumínio (Fosfina/3 g por tonelada de grão), as amostras do feijão foram quarteadas, separadas em três repetições, embaladas a vácuo e enviadas ao Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, onde foram armazenadas em embalagens lacradas de polipropileno à temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, com controle de umidade relativa inferior a 65%, por seis meses (180 dias).

Após o armazenamento, o feijão foi cozido sob pressão em calor úmido (proporção de 1:2, p/v) por 50 ± 5 min, sem maceração prévia, em triplicata, até atingir consistência macia, própria para consumo. A proporção de água usada na cocção não gerou caldo residual e os grãos cozidos foram secos em estufa com circulação de ar (MA 035, Marconi®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 8 horas à 60°C e triturados em moinho analítico (Grinder Vertical Rotor MA 090 CET, Marconi®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com peneira ($600 \mu\text{m}$, 30 mesh) (DIAS et al., 2015; ALVES et al., 2016a). As farinhas foram embaladas a vácuo e mantidas à -20°C até o preparo das dietas experimentais e da análise de compostos fenólicos totais.

O feijão BRSMG Madrepérola foi selecionado para utilização no estudo *in vivo* com base em resultados de estudo *in vitro* em que o hidrolisado proteico desse cultivar inibiu marcadores inflamatórios (interleucina 1β e prostaglandina E-2), em modelo de

inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células THP-1 humanas semelhantes a macrófagos (ALVES et al., 2016a).

6.2.2 Hidrolisado proteico

O hidrolisado proteico de feijão cozido foi preparado no Laboratório “*Food Science and Human Nutrition in University of Illinois at Urbana-Champaign-USA*”. Este foi obtido por meio de digestão enzimática simulada com as enzimas pepsina e pancreatina, conforme metodologia proposta por Megías et al. (2004). Os processos de filtração e identificação de peptídeos seguiram os protocolos de Alves et al. (2016a). As amostras foram armazenadas à -20°C até o momento do ensaio biológico e da análise de compostos fenólicos totais.

6.2.3 Compostos fenólicos

Os extratos da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão usados para a quantificação de fenólicos totais foram obtidos por maceração das amostras em metanol 60% à temperatura ambiente (BLOOR, 2001). Os compostos fenólicos totais foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A quantificação dos fenólicos totais ocorreu por meio de curva analítica obtida com concentrações de ácido gálico de 0 a 250 ppm ($y = 0,0009x - 0,0012$, $R^2 = 0,9965$ - farinha integral de feijão cozido; $y = 0,0009x + 0,0046$, $R^2 = 0,9975$ - hidrolisado proteico de feijão) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g⁻¹).

O perfil de compostos fenólicos da farinha integral de feijão cozido e do hidrolisado proteico foi determinado no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará. Os compostos foram extraídos a partir de 400 mg das amostras com 10 mL de solução metanol/água/ácido clorídrico (50:48:2). As análises foram realizadas no UPLC-ESI-QTOF-MS/MS (Acquity® UPLC/XEVO®, Waters®, Milford, Massachusetts, Estados Unidos) equipado com sistema QtoF (Waters®) e software *Masslynx* 4.1 (Waters®) usando as condições cromatográficas descritas por Huang et al. (2013), Iswaldi et al. (2013), Journi et al. (2015) e Singh et al. (2015). As estruturas dos fenólicos identificados na farinha cozida e no hidrolisado proteico de feijão BRSMG Madrepérola foram obtidos

na base de dados PubChem Compound, hospedada na plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information).

6.2.4 Desenho experimental

Os camundongos machos adultos BALB/c (n= 48) foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inox, sob temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) e com ciclo claro e escuro de 12 horas. Os animais foram divididos em 4 grupos (AIN-93M, HFCD, HFCD-WF, HFCD-PH), n= 12, com distribuição de peso semelhante ($33,28 \text{ g} \pm 2,82 \text{ g}$), de acordo com a AOAC (2016).

O controle normal (n= 12) recebeu dieta AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e os demais grupos (n= 36) consumiram dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica (HFCD) (ANANDHI; THOMAS; GERALDINE, 2014; COLINACOCA et al., 2014) e água destilada *ad libitum* (Tabela 5), por nove semanas. A dieta do grupo HFCD-WF foi adicionada de farinha integral de feijão cozido ($346,60 \text{ g/Kg}$ de dieta), considerando-se que 50% do conteúdo proteico dessa dieta é proveniente do feijão. Ao grupo HFCD-PH, foi administrado hidrolisado proteico de feijão por gavagem (700 mg/Kg de animal/dia). O 2-thiouracil foi usado com a finalidade de assegurar a indução da hipercolesterolemia nos grupos que consumiram dieta HFCD, pois atua inibindo o hormônio da tireoide (JORIS et al., 1983; PELLIZZON, 2008). Este reagente foi diluído no hidrolisado proteico ou em água, e ofertado por gavagem ($500 \mu\text{L}$) ao grupo HFCD-PH e aos grupos HFCD (HFCD e HFCD-WF), respectivamente, na concentração de 10 mg/Kg de animal/dia (PANDA; KAR, 2005; PANDA; KAR; PATIL, 2009). O grupo controle normal (AIN-93M) recebeu água destilada por gavagem em igual volume ($500 \mu\text{L}$) ofertado aos demais grupos experimentais. O peso e o consumo alimentar dos animais foram monitorados durante as nove semanas de experimentação e o comprimento naso-anal (cm) foi mensurado na última semana do ensaio *in vivo*.

Tabela 5. Composição das dietas experimentais (g/Kg de dieta)

| Ingrediente (g/Kg) | AIN-93M | HFCD | HFCD-WF | HFCD-PH |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Amido de milho | 422,96 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Farinha de feijão integral cozida | 0,00 | 0,00 | 346,60 | 0,00 |
| Sacarose | 100,00 | 300,00 | 218,63 | 300,00 |
| Gordura vegetal hidrogenada | 0,00 | 200,00 | 200,00 | 200,00 |
| Caseína* | 170,73 | 218,19 | 124,47 | 218,19 |
| Amido dextrinizado | 155,00 | 105,50 | 0,00 | 105,50 |
| Fibra | 62,01 | 62,01 | 0,00 | 62,01 |
| Óleo de soja | 40,00 | 40,00 | 36,00 | 40,00 |
| Mix mineral | 35,00 | 35,00 | 35,00 | 35,00 |
| Mix vitamínico | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| Colesterol | 0,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 |
| Bitartarato de colina | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 |
| Ácido cólico | 0,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| L-cistina | 1,80 | 1,80 | 1,80 | 1,80 |
| Carboidrato (% calorías) | 72,22 | 33,55 | 32,03 | 33,55 |
| Proteína (% calorías) | 18,19 | 18,05 | 17,94 | 18,05 |
| Lipídios (% calorías) | 9,59 | 48,40 | 50,03 | 48,40 |
| Energia (kcal/Kg) | 3754,76 | 4834,76 | 4677,97 | 4834,76 |
| DC (kcal/g⁻¹) | 3,75 | 4,83 | 4,67 | 4,83 |

*Pureza de 82%. AIN93-M; HFDC= dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica; HFCD-WF= HFCD + farinha integral de feijão cozido; HFCD-PH= HFCD + hidrolisado proteico de feijão; DC= densidade calórica.

Ao final de 63 dias, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com gel (BD Vacutainer®), centrifugados a 1.000 x g por 10 minutos (FANEM®, São Paulo, Brasil) para separação do soro, seguido de armazenamento a -80°C. Após a eutanásia, o fígado foi retirado, pesado e imediatamente imerso em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a -80°C até o início das análises.

O ensaio biológico foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFV) da UFV, Viçosa, Minas Gerais, em 04/03/2016, sob o processo nº 97/2015.

Medidas biométricas e de consumo alimentar

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela relação entre o peso e o comprimento naso-anal (cm) elevado ao quadrado (KEYS et al., 1972). O índice hepatossomático (IHS) foi calculado pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal multiplicado por 100 (RICKER, 1979). O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação do ganho de peso e a quantidade total de dieta consumida e o coeficiente de eficiência energética (CEE) obtido pela relação entre o ganho de peso corporal dos animais e o total de calorias consumidas multiplicado por 1000 kcal. O consumo de fenólicos foi estimado com base nas concentrações de fenólicos totais da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão.

Análises bioquímicas

Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), triacilglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) por métodos colorimétricos de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin®) no analisador automático para química analítica BS-200 (Mindray®, Shenzhen, China).

Homogenato e quantificação de proteína do fígado

O homogenato foi obtido da maceração de 100 mg de fígado com 1 mL de tampão fosfato pH 7,4, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos à temperatura de 4°C (Hitachi Koki Co., Ltd®, Tokyo, Japão). A proteína total dos homogenatos foi determinada segundo metodologia de Bradford (1976) em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 595 nm e os resultados foram expressos em mg de proteína/mL.

Capacidade antioxidante total do fígado e do soro

A capacidade antioxidante total (CAT) do homogenato do fígado e do soro foi avaliada por meio dos procedimentos do kit *Antioxidant Assay Kit* (Sigma-Aldrich®). A leitura da inibição do cátion radical ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico (ABTS) pelos antioxidantes foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 405 nm. A quantificação da CAT das amostras

foi realizada por meio de curva-padrão de Trolox e os resultados do fígado foram expressos em mM equivalentes de Trolox por mg de proteína (mM/mg proteína) e do soro em mM equivalentes de Trolox em 1 mL de soro (mM/mL).

Análise dos níveis de peroxidação lipídica no fígado e no soro

A peroxidação lipídica no fígado e no soro foi avaliada pela quantificação de malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo celular, por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE; AUST, 1978). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 535 nm. A quantificação do MDA nas amostras foi realizada por meio de curva-padrão do reagente 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) e os resultados do fígado foram expressos em nM/mg de proteína e do soro em nM/mL de soro.

Atividade enzimática da superóxido dismutase

A quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com Marklund (1985). A unidade relativa de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO) a 570 nm e os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

Atividade enzimática da catalase

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e o oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984). A leitura da cinética enzimática da catalase foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Evolution 60S, EUA) e o resultado foi expresso como U de catalase/mg de proteína.

Expressão gênica

O mRNA foi extraído do fígado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, EUA), de acordo com a metodologia do fabricante. As concentrações e purezas do mRNA e do cDNA foram

quantificadas em espectrofotômetro a 260/280 nm e 260/230 nm (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO).

A quantificação relativa da expressão gênica das proteínas envolvidas no estresse oxidativo e na inflamação no fígado foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR), utilizando o equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific), quantificação por fluorescência SYBR-Green, software Primer Express (Applied Biosystems, CA, EUA) e com o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA). A expressão relativa de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As condições de amplificação dos genes, ciclo da PCR, foram a desnaturação inicial de 95°C (10 min.) e então 40 ciclos, com 1 min. de desnaturação (94°C), 1 minuto de anelamento (56°C) e 2 minutos de alongamento (72°C), seguidos da curva padrão de dissociação. Os dados de RT-PCR foram analisados com o método $\Delta\Delta CT$ (HETTINGER et al., 2001).

Os genes avaliados foram: *heat shock proteins* (HSP72), superóxido dismutase (SOD), fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB), fator de necrose tumoral α (TNF α); interleucina 10 (IL-10) e receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α). Os iniciadores da amplificação dos genes foram: GAPDH: senso-AGGTTGTCTCCTGTCCTTTC e antisenso-CTGTTGCTGTAGCCATATTC; TNF α : senso-ACGGCATGGATCTCAAAGAC e antisenso-AGATAGCAAATCGGCTGACG; IL10: senso-ACTACCATAGCCACAACGCA e antisenso-TTTCTGTTTCCTACGGCGCT; NFkB: senso-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA e antisenso-TCGCACTTGTAACGGAAACG; PPAR α : senso-CCTGCCTTCCCTGTGAACT e antisenso-ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA; SOD: senso-TGTGTCCATTGAAGATCGTGTG e antisenso-CTTCCAGCATTTCCAGTCTTTG e HSP72 senso-AGGCCAACAAGATCACCATC e antisenso-TAGGACTCGAGCGCATTCTT.

Conteúdo de umidade e lipídios das fezes

O conteúdo de umidade nas fezes, coletadas ao fim do experimento, foi determinado pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C, durante 24 horas (AOAC, 2016). A quantificação de lipídios foi realizada por extração em aparelho de Soxhlet, utilizando éter etílico como extrator, por 8 horas, sob refluxo (AOAC, 2016).

6.2.5 Análise estatística

Os resultados de concentrações e perfil de compostos fenólicos na farinha integral de feijão cozido e no hidrolisado proteico de feijão não foram avaliados estatisticamente. Os dados do ensaio biológico foram plotados no gráfico de dispersão *scatter plot* para a identificação dos *outliers* e os dados fora da distribuição foram eliminados. Após a exclusão dos *outliers*, o número inicial de 12 animais foi reduzido para oito, número mínimo de animais (n= 8) por grupo indicados no cálculo amostral do ensaio biológico (IC = 0,95). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi aplicada a análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para as variáveis paramétricas e Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para as variáveis não-paramétricas. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%. Todas as análises do ensaio biológico foram realizadas no software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), versão 6.0.

6.3 RESULTADOS

Fenólicos

As concentrações de compostos fenólicos totais na farinha integral de feijão cozido e no hidrolisado proteico de feijão foram de $140,0 \pm 5,87 \mu\text{g EAG/g}$ e $1.025,6 \pm 99,14 \mu\text{g EAG/g}$ de amostra, respectivamente. As análises cromatográficas e as características dos compostos fenólicos identificados na farinha integral e no hidrolisado proteico de feijão são apresentadas na Figura 7 e Tabela 6, respectivamente. Os compostos fenólicos identificados na farinha integral de feijão foram a catequina e kaempferol (Figura 7A). No extrato do hidrolisado proteico de feijão, a análise química identificou apenas o kaempferol (Figura 7B).

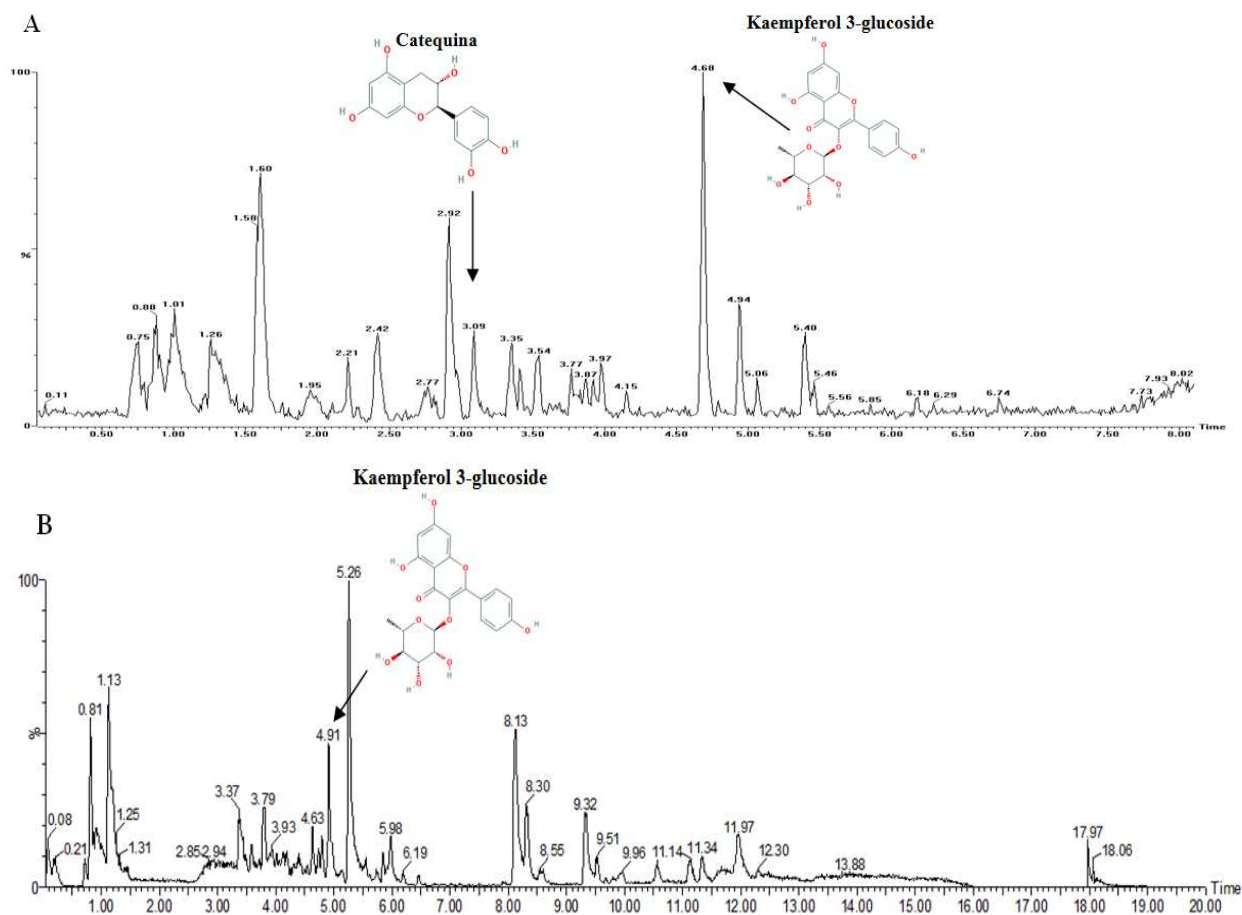


Figura 7. Cromatogramas e estruturas químicas correspondentes aos fitoquímicos dos extratos da farinha integral de feijão cozido (A) e do hidrolisado proteico (B) do feijão BRSMG Madrepérola. A seta indica o tempo de retenção da catequina e do kaempferol 3-glucoside.

Tabela 6. Características espectrais de massa LC-UV-visible-MS de compostos fenólicos em extrato metanólico da farinha integral e do hidrolisado proteico de *Phaseolus vulgaris* L.

| Nº Pico | Composto Identificado | RT (min) | Peso molecular |
|--|------------------------|----------|----------------|
| Farinha Integral de Feijão Cozido | | | |
| 1 | Ácido cítrico | 1,32 | 191 |
| 2 | Catequina | 3,09 | 289 |
| 3 | Kaempferol 3-glucoside | 4,69 | 447 |
| Hidrolisado Proteico de Feijão | | | |
| 1 | Ácido cítrico | 0,99 | 191 |
| 2 | Kaempferol 3-glucoside | 4,91 | 447 |

Medidas biométricas e de consumo alimentar

Os grupos controle normal (AIN-93M), controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico (HFCD), HFCD + farinha integral de feijão (HFCD-WF) e HFCD + hidrolisado proteico (HFCD-PH), não diferiram ($p > 0,05$) quanto ao peso inicial, demonstrando que todos os grupos experimentais foram homogêneos no início do ensaio biológico (Tabela 7).

O peso final e o IMC do grupo HFCD-PH não diferiram ($p > 0,05$) dos controles AIN-93M e HFCD, porém foi 9,0% e 11,1% menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo HFCD-WF nas duas medidas biométricas, respectivamente. Além disso, o grupo alimentado com farinha integral de feijão também apresentou maior IMC ($p < 0,05$) (14,0%) em relação aos animais do controle normal (AIN-93M). O consumo do hidrolisado proteico de feijão no grupo HFCD-PH durante nove semanas foi eficaz em reduzir aproximadamente 27,4% ($p < 0,05$) o ganho de peso dos animais em relação aos grupos HFCD e HFCD-WF. O peso do fígado e o índice hepatossomático do controle normal foi menor ($p < 0,05$) em relação aos grupos HFCD e HFCD-WF, respectivamente, 43,2% e 41,0%. O grupo HFCD-PH apresentou menor ($p < 0,05$) peso do fígado (29,0%) e índice hepatossomático (17,3%) em relação ao grupo HFCD-WF, no entanto, não diferiu ($p > 0,05$) do grupo HFCD (Tabela 7).

O consumo alimentar do grupo HFCD-PH foi em média 14,7% menor ($p < 0,05$) comparado aos grupos controles e ao HFCD-WF. Além disso, as relações do consumo alimentar com as medidas biométricas, CEA e CEE, também foram 32,3% e 30,5% menores ($p < 0,05$), respectivamente, no grupo HFCD-PH em relação ao controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico (HFCD). O grupo HFCD-WF consumiu mais compostos fenólicos ($1.842,20 \pm 141,80 \mu\text{g EAG}$) em relação ao HFCD-PH ($27,37 \pm 1,78 \mu\text{g EAG}$) (Tabela 7).

Tabela 7. Medidas biométricas e de consumo alimentar dos camundongos

| | AIN-93M | HFC D | HFC D-WF | HFC D-PH |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Peso Inicial (g) | 32,26±2,04 ^a | 32,28±1,80 ^a | 32,63±2,54 ^a | 33,34±1,69 ^a |
| Peso Final (g) | 41,58±2,04 ^{a,b} | 43,63±2,36 ^{a,b} | 44,70±3,45 ^a | 40,69±1,81 ^b |
| Ganho de peso (g) | 9,80±1,38 ^{a,b} | 10,70±1,99 ^a | 10,59±2,86 ^a | 7,72±1,10 ^b |
| IMC (g.cm ⁻²) | 0,37±0,02 ^b | 0,39±0,02 ^{a,b} | 0,42±0,03 ^a | 0,38±0,01 ^b |
| Peso do Fígado (g) | 1,69±0,11 ^c | 2,70±0,32 ^{a,b} | 3,35±0,48 ^a | 2,38±0,28 ^{b,c} |
| Índice Hepatosomático (%) | 4,04±0,36 ^c | 6,28±0,65 ^b | 7,49±0,46 ^a | 6,19±0,89 ^b |
| Consumo Alimentar (g/semana) | 37,80±2,47 ^a | 36,81±3,59 ^a | 38,19±2,15 ^a | 32,04±2,38 ^b |
| CEA (g) | 0,03±0,000 ^{a,b} | 0,03±0,004 ^a | 0,03±0,007 ^{a,b} | 0,02±0,005 ^b |
| CEE (g.1000 Kcal ⁻¹) | 7,60±1,26 ^a | 7,70±0,78 ^a | 6,67±1,20 ^{a,b} | 5,35±0,61 ^b |
| Consumo de fenólicos (µg EAG/semana)* | --- | --- | 1.842,20±141,80 | 27,37±1,78 |

Valores em média e desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey ou Dunn's a 5% de probabilidade. AIN-93M: controle normal; HDC: controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico; HFC D-WF: HFC D + farinha integral de feijão; HFC D-PH: HFC D + hidrolisado proteico de feijão; CEA: coeficiente de eficiência alimentar; CEE: coeficiente de eficiência energética; EAG: equivalente de ácido gálico. *Calculado com base nas ingestões e concentrações de compostos fenólicos da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão.

Perfil bioquímico e conteúdo de umidade e lipídios nas fezes

As atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e do aspartato aminotransferase (AST) foram, respectivamente, 37,8% e 28,7% em média, menores (p<0,05) no grupo HFC D-WF comparado aos grupos HFC D e HFC D-PH (Figura 8A). O consumo de hidrolisado proteico não reduziu (p>0,05) as concentrações de AST e ALT no grupo HFC D-PH, pois este não deferiu do controle HFC D. O grupo controle normal (AIN-93M) apresentou a menor (p<0,05) atividade de AST em relação aos demais grupos experimentais (Figura 8A).

A glicemia dos grupos controles não diferiu (p>0,05), no entanto, os tratamentos com farinha integral de feijão e com o seu hidrolisado proteico foram eficazes em

reduzir ($p < 0,05$) as concentrações de glicose em média 18,5% e 16,7% em relação aos grupos AIN-93M e HFCD, respectivamente (Figura 8B). O grupo AIN-93M apresentou as maiores ($p < 0,05$) concentrações de triacilglicerídeos em relação aos demais grupos experimentais, enquanto que o controle HFCD expressou a maior ($p > 0,05$) média de colesterol total (Figura 8C). As intervenções reduziram ($p < 0,05$) as concentrações de colesterol total nos grupos HFCD-WF e HFCD-PH em média 21,7% em relação ao grupo HFCD, porém não diferiram ($p > 0,05$) em relação às concentrações de HDL e LDL (Figura 8C). A razão CT/HDL não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, enquanto que a razão de HDL/LDL foi maior ($p < 0,05$) para o grupo AIN-93M (Figura 8D).

A farinha integral de feijão foi eficaz em aumentar ($p < 0,05$) a excreção de lipídios (9,7%) e as concentrações de umidade (98,4%) nas fezes dos animais do grupo HFCD-WF em relação aos grupos HFCD e HFCD-PH (Figura 8E). O hidrolisado proteico de feijão aumentou a concentração de lipídios nas fezes em comparação ao grupo AIN-93M, porém não diferiu ($p > 0,05$) do grupo controle HFCD (Figura 8E).

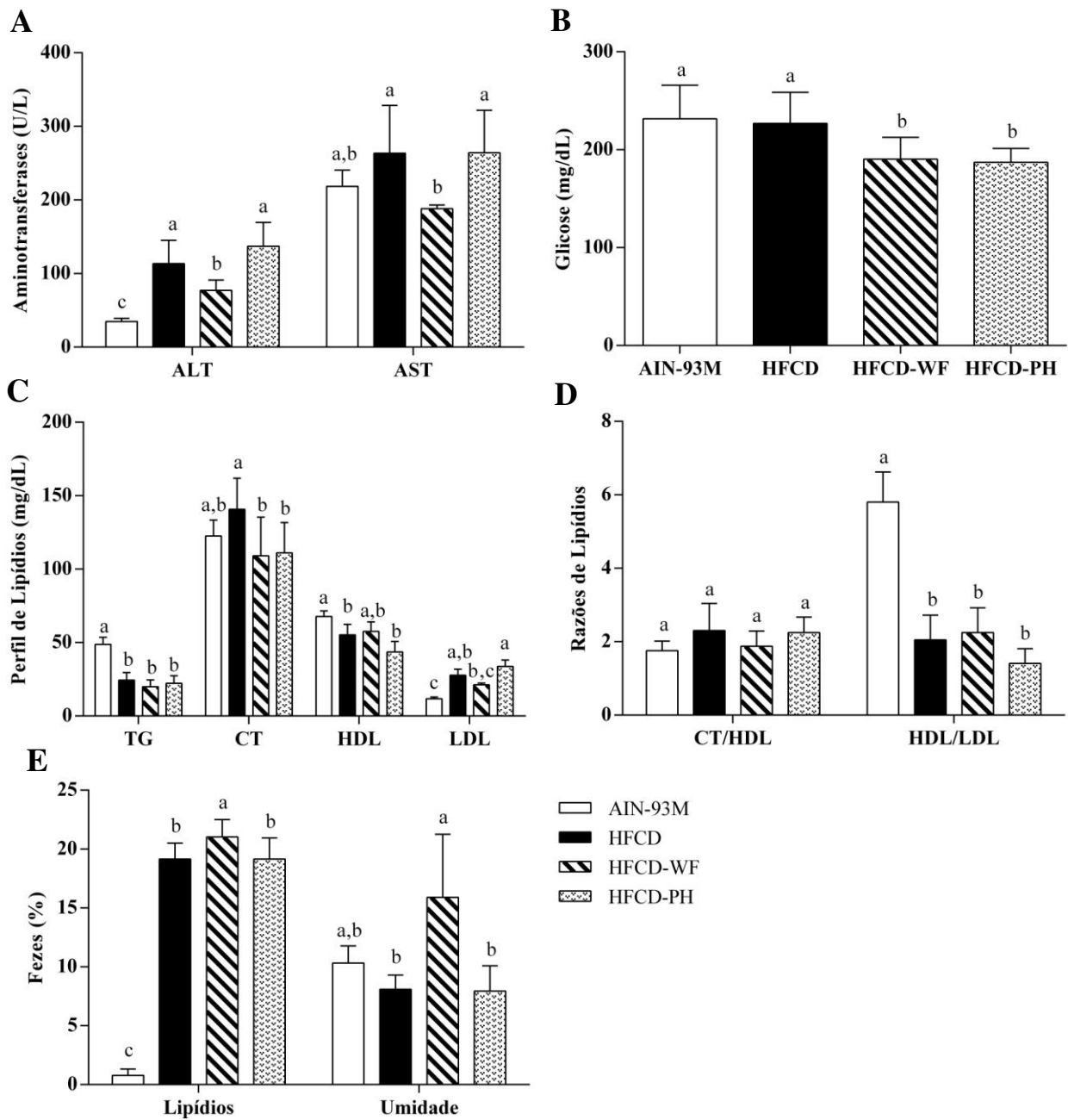


Figura 8. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na atividade das enzimas hepáticas (A), glicemia (B), perfil de lipídios (C), razões de lipídios CT/HDL e HDL/LDL (D) e no conteúdo de umidade e lipídios das fezes (E) dos camundongos após 9 semanas de experimentação.

Valores em média e desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ou Dunn's a 5% de probabilidade. AIN-93M: controle normal; HDC: controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico; HFCD-WF: HFCD + farinha integral de feijão; HFCD-PH: HFCD + hidrolisado proteico de feijão; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TG: triacilglicerídeos; CT: colesterol total; HDL: *high density lipoprotein*; LDL: *low density lipoprotein*.

Estresse oxidativo

A capacidade antioxidante total (CAT) do fígado não diferiu ($p>0,05$) entre os grupos experimentais (Figura 9A). No entanto, observou-se que os grupos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, controle (HFCD) e com as intervenções com farinha integral de feijão (HFCD-WF) e com hidrolisado proteico de feijão (HFCD-PH), apresentaram CAT do soro em média 13,1% maior ($p<0,05$) em relação ao controle normal (AIN-93M) (Figura 9B). Em relação a peroxidação lipídica, também foi observado que a produção de MDA no fígado não diferiu entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (Figura 9C). No entanto, as intervenções HFCD-WF e HFCD-PH foram eficazes em reduzir ($p<0,05$) em média 15,2% as concentrações de malondialdeído (MDA) no soro, em relação aos animais alimentados com AIN-93M e reduzir ($p<0,05$) em média 11,5% a peroxidação lipídica em comparação ao controle HFCD (Figura 9D).

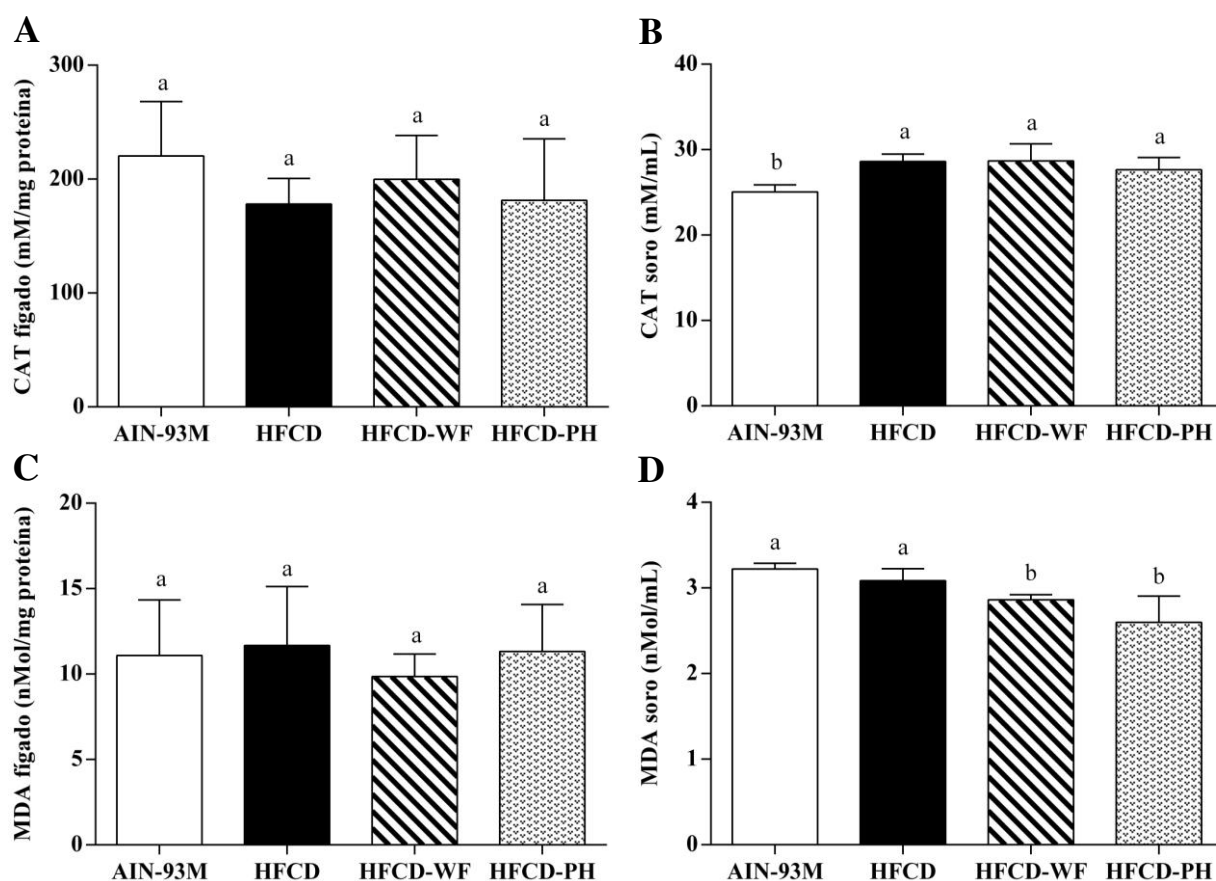


Figura 9. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na capacidade antioxidante total (CAT) e na peroxidação lipídica (MDA) no fígado (A e C) e no soro (B e D) dos camundongos após 9 semanas de experimentação.

Valores em média e desvio padrão ($n = 8$). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ou Dunn's a 5% de probabilidade. AIN-93M: controle normal; HDC: controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico; HFCD-WF: HFCD + farinha integral de feijão; HFCD-PH: HFCD + hidrolisado proteico de feijão; MDA: malondialdeído.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) no grupo AIN-93M não diferiu ($p>0,05$) em relação aos demais grupos experimentais (Figura 10A), porém observou-se que a expressão gênica dessa enzima antioxidante foi em média 0,3 vezes superior ($p<0,05$) aos grupos HFCD (Figura 10C). Em relação a catalase, o grupo AIN-93M apresentou em média 62,2% maior ($p>0,05$) atividade dessa enzima no fígado em relação ao controle HFCD e ao grupo HFCD-WF (Figura 10B). No grupo HFCD não foram observados aumento ($p>0,05$) da atividade das enzimas do mecanismo antioxidante (Figuras 10A e 10B) e na expressão da SOD (Figura 10C), entretanto, a expressão da HSP72 foi 2,7 vezes maior ($p<0,05$) em relação aos grupos AIN-93M e HFCD-WF (Figura 10D).

A intervenção com farinha integral de feijão no grupo HFCD-WF não aumentou ($p>0,05$) a atividade enzimática da catalase (Figura 10B) e a expressão gênica da SOD e da HSP72 (Figuras 10C e 10D). No entanto, o consumo de farinha integral de feijão foi capaz de elevar ($p<0,05$) em 29,1% a atividade da SOD em relação ao controle HFCD (Figura 10A). O tratamento com o hidrolisado proteico de feijão não promoveu o aumento ($p>0,05$) da atividade e expressão das enzimas antioxidantes nos animais em relação aos grupos controles (AIN-93M e HFCD) (Figuras 10A, 10B e 10C), porém estimulou a maior ($p<0,05$) expressão de HSP72 comparado aos animais alimentados com dieta AIN-93M e tratados com farinha integral de feijão cozido (Figura 10D).

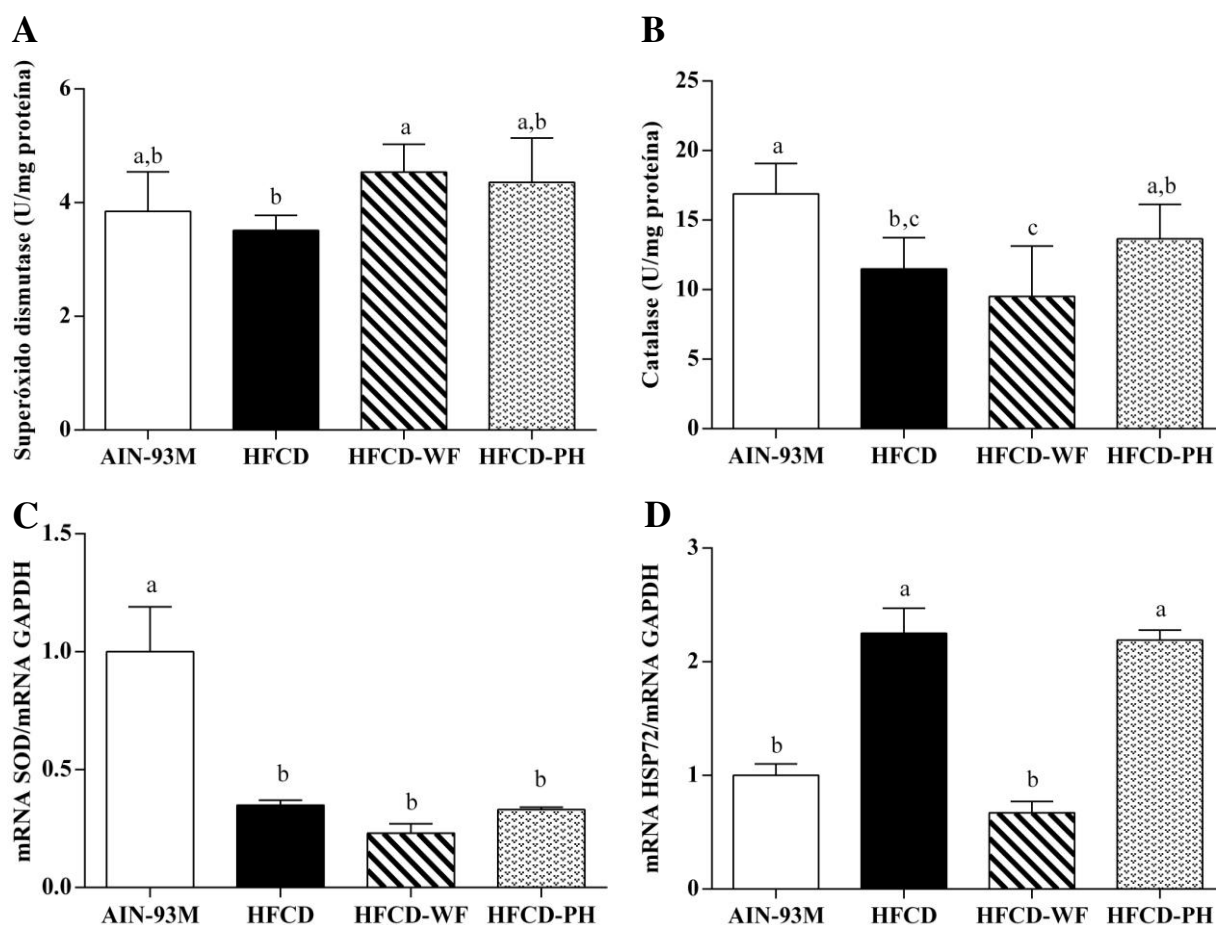


Figura 10. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na atividade e expressão gênica da superóxido dismutase (SOD) (A e C), na atividade da enzima catalase (B) e na expressão gênica da *heat shock protein 72* (HSP72) (D) no fígado dos camundongos após 9 semanas de experimentação.

Valores em média e desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ou Dunn's a 5% de probabilidade. AIN-93M: controle normal; HDC: controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico; HFCD-WF: HFCD + farinha integral de feijão; HFCD-PH: HFCD + hidrolisado proteico de feijão.

Expressão gênica

O grupo AIN-93M apresentou maior expressão ($p > 0,05$) de IL-10 e PPAR α (Figuras 11B e 11D) e menor expressão ($p < 0,05$) dos genes relacionados ao processo inflamatório (TNF α e NFkB) (Figuras 11A e 11C) em relação aos demais grupos experimentais. Enquanto que o grupo controle HFCD apresentou em média 1,6 vezes e 7,8 vezes maior ($p < 0,05$) expressão de TNF α e NFkB, respectivamente, em comparação aos demais grupos experimentais (Figuras 11A e 11C). O HFCD apresentou ainda menor expressão ($p < 0,05$) de IL-10 (0,05 vezes) e de PPAR α (0,59 vezes) em relação ao grupo controle normal (AIN-93M) (Figuras 11B e 11D).

A expressão gênica de TNF α no grupo HFCD-WF foi semelhante ao controle HFCD ($p>0,05$) (Figura 11A), entretanto, a expressão de NFkB foi 18,63 vezes inferior ($p<0,05$) no grupo que recebeu a intervenção com farinha integral de feijão em relação ao mesmo controle (Figura 11C). A intervenção com o hidrolisado proteico de feijão reduziu ($p<0,05$) a expressão gênica de TNF α em 1,58 vezes e a expressão de NFkB em 2,42 vezes (Figuras 11A e 11C) em comparação ao controle HFCD. Dentre as intervenções, o tratamento dos animais com farinha integral de feijão foi mais eficaz em reduzir a expressão de NFkB (Figura 11C). Em relação a via anti-inflamatória, a expressão gênica de IL-10 e PPAR α não diferiu ($p>0,05$) entre o controle HFCD e os grupos tratamentos HFCD-WF e HFCD-PH (Figuras 11B e 11D).

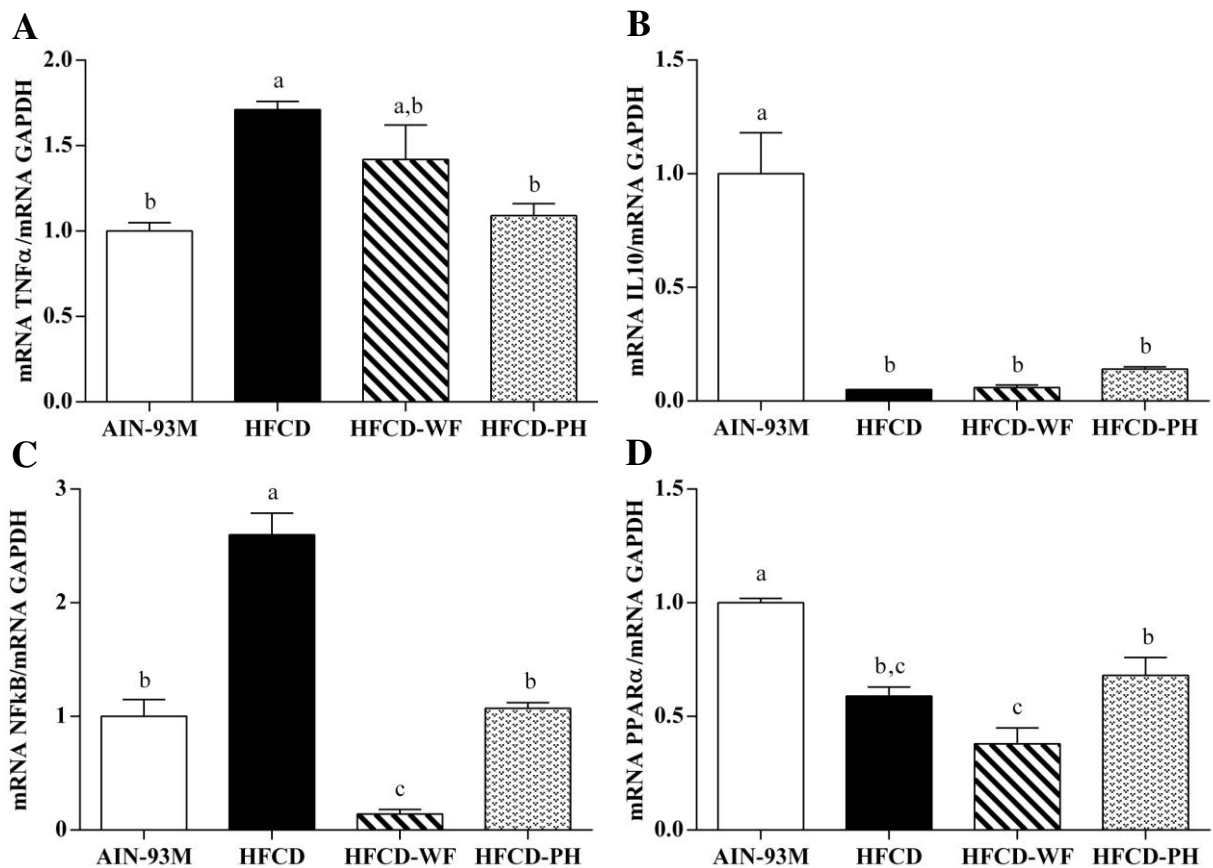


Figura 11. Efeito da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão na expressão de gênica de proteínas ligadas a inflamação no fígado dos camundongos após 9 semanas de experimentação: fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (A), interleucina 10 (IL 10) (B), fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB) (C), receptores proliferadores peroxissomais alfa (PPAR α) (D).

Valores em média e desvio padrão (n = 4). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. AIN-93M: controle normal; HDC: controle hiperlipídico e hipercolesterolêmico; HFCD-WF: HFCD + farinha integral de feijão; HFCD-PH: HFCD + hidrolisado proteico de feijão.

6.4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos do consumo de farinha integral de feijão cozido e do hidrolisado proteico de feijão sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório em camundongos BALB/c alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, devido as evidências de que os compostos fenólicos, os hidrolisados e os peptídeos bioativos do feijão apresentam efeitos antioxidante e anti-inflamatório (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014; ALVES et al., 2016ab; WANG et al., 2016).

O hidrolisado proteico de feijão apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos em relação a farinha integral de feijão cozido, provavelmente porque a digestão da farinha com as enzimas pepsina e pancreatina liberou os fenólicos complexados (lignificados) às proteínas da matriz alimentar, aumentando as concentrações e a retenção de fenólicos totais no hidrolisado proteico e, conseqüentemente, aumentando a extração desses compostos reagentes ao Folin-Ciocalteu (KOSIŃSKA et al., 2011; TARKO; DUDA-CHODAK; ZAJAC, 2013; VANIER et al., 2014). A catequina e o kaempferol, compostos fenólicos identificados na farinha integral e kaempferol no hidrolisado proteico do presente estudo, são fitoquímicos encontrados no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (DUEÑAS et al., 2016) com propriedades de inibir danos na cadeia de DNA e a oxidação do LDL (DE CAMARGO et al., 2014).

O consumo excessivo de gordura saturada e de açúcares simples está relacionado ao aumento da adiposidade e também com a formação de depósitos de gordura em outros tecidos, como o cardíaco e o hepático (ANDRADE et al., 2013; NAIR et al., 2014). Apesar da dieta experimental HFCD ser rica em açúcares simples, colesterol e em gordura saturada, ela não é eficiente em induzir alterações nas medidas biométricas, no perfil bioquímico e em promover o processo aterosclerótico nos camundongos, devido aos roedores apresentarem elevadas concentrações de HDL (lipoproteína de alta densidade) (JORIS et al., 1983; PELLIZZON, 2008). Portanto, houve a necessidade da utilização de inibidores do hormônio da tireoide para garantir os efeitos deletérios decorrentes do consumo da dieta HFCD. No presente estudo esses efeitos foram alcançados por meio da utilização do 2-thiouracil associada à ingestão da dieta HFCD

(PANDA; KAR, 2005; PANDA; KAR; PATIL, 2009; LEE et al., 2014; RITZE et al., 2014).

O grupo HFCD apresentou aumento da glicemia, alteração do perfil lipídico (colesterol total, HDL e LDL) e aumento da atividade das enzimas hepáticas em função do consumo elevado de açúcares simples, colesterol e de gordura saturada pela dieta hipercolesterolêmica (HFCD). Possivelmente os animais controle HFCD apresentaram deposição de gordura no tecido hepático, pois a atividade aumentada de ALT e AST indicam presença de lesão no fígado (RAMAIAH, 2007). O aumento das concentrações de glicose e de triacilglicerídeos observados no grupo controle AIN-93M, possivelmente estão relacionados ao alto consumo de carboidratos simples, pois aproximadamente 70% do conteúdo energético da dieta controle normal é proveniente do amido de milho, amido dextrinizado e da sacarose. O consumo desses carboidratos simples em excesso e a longo prazo está associado ao desenvolvimento da resistência à insulina, hormônio responsável pelo controle da glicemia, e com o desequilíbrio do perfil de lipídios (WALCHER; MARX, 2004; JELLINGER, 2007; GALLAGHER; LEROITH; KARNIELI, 2010).

Além disso, a semelhança nas concentrações de glicose e a observação de resultados não significativos em relação ao conteúdo de umidade e lipídios nas fezes entre os grupos que consumiram dieta normal (AIN-93M) e dieta hipercolesterolêmica (HFCD) podem estar relacionados também com a ausência de fibras solúveis na composição dessas dietas, pois esse nutriente é responsável por reduzir a glicemia e por aumentar a retenção de umidade e a excreção de lipídios nas fezes (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015).

Apesar do aumento da glicemia e dos triacilglicerídeos, observa-se que possivelmente o grupo AIN-93M não apresentou deposição de gordura no tecido hepático, pois o peso do fígado, o índice hepatossomático e a concentração da enzima de função hepática ALT foram menores no controle normal em relação ao controle HFCD e aos demais grupos experimentais. Além disso, houve aumento da concentração de HDL e redução do LDL, resultados refletidos também pela melhora na razão HDL/LDL no grupo AIN-93M.

A intervenção com farinha integral de feijão cozido não foi eficaz em alterar as medidas biométricas e de consumo alimentar nos animais, apesar do consumo de fenólicos ser qualitativamente maior no grupo HFCD-WF, em quantidade ($1.842,20 \pm 141,80 \mu\text{g EAG}$) e em variedade de fenólicos (catequina e kaempferol), em relação ao HFCD-PH. Existem evidências de que o consumo de farinha integral de feijão e de alimentos ricos em compostos fenólicos, principalmente catequina e kaempferol, são capazes de reduzir o peso corporal dos animais, de prevenir doenças cardiovasculares e a obesidade ocasionadas pelo consumo de dieta hipercolesterolêmica e hiperlipídica (SHEN et al., 2012; HOSSAIN et al., 2016; NATAL et al., 2016; KIM et al., 2016).

Em nosso estudo, o tratamento do grupo HFCD-WF não reduziu o peso do fígado e o IHS, no entanto, foi capaz de reduzir a atividade das enzimas ALT e AST, indicando que possivelmente não houveram lesões hepáticas nesses animais (RAMAIAH, 2007). Os primeiros achados do grupo HFCD-WF discordam da literatura, pois observou-se que a suplementação da dieta HFCD com farinha integral de feijão adzuki (*Phaseolus angularis*) reduziu o peso do fígado dos camundongos (KIM et al., 2016). Para confirmar que o tratamento com farinha integral de feijão reduziu as lesões hepáticas provocadas pelo consumo da dieta HFCD, é necessário também a realização de análises histológicas do fígado.

O consumo de farinha integral de feijão no grupo HFCD-WF reduziu também as concentrações de glicose e de colesterol total em relação aos grupos que consumiram dieta HFCD, e a concentração de LDL dos animais quando comparado ao grupo tratado com hidrolisado proteico de feijão. O grupo HFCD-WF não apresentou aumento das concentrações de HDL, no entanto, o conteúdo de umidade e a excreção de lipídios nas fezes desses animais foram relevantes. Esses efeitos no grupo HFCD-WF estão relacionados provavelmente ao conteúdo de fibras alimentares da farinha integral de feijão, reconhecidas por reduzir a glicemia e o colesterol, além de inibir a absorção intestinal de lipídios (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015). Os dois principais mecanismos de regulação dos lipídios séricos pelas fibras alimentares são a redução parcial da absorção do colesterol no lúmen do intestino delgado e pelas propriedades físico-químicas desse nutriente de aumentar a retenção de água, viscosidade, volume e fermentabilidade das fezes e ainda a capacidade de quelar ácidos biliares

(SCHNEEMAN, 1999, 2001; JENKINS et al., 2006; ANDERSON et al., 2009; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2012).

A ingestão do hidrolisado proteico de feijão atenuou os efeitos negativos do consumo da dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica (HFCD), pois o grupo HFCD-PH apresentou redução do ganho de peso, consumo alimentar, CEA, CEE e nas concentrações de glicose e colesterol total. Esses efeitos estão relacionados a presença de sequências de peptídeos, identificadas no hidrolisado proteico do feijão Madrepérola, com elevada atividade biológica de inibição da enzima *dipeptidyl peptide protease IV* (DPP-IV), (ALVES et al., 2016ab). A função da DPP-IV é degradar a *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP) e a *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), incretinas responsáveis por regular a glicemia pós-prandial, aumentar a secreção de insulina, reduzir a produção de glicose pelo fígado e retardar o esvaziamento gástrico (ENGEL et al., 2006; CARON et al., 2016). Portanto, o hidrolisado proteico de feijão apresentou efeito benéfico, possivelmente, por aumentar a saciedade, reduzir o ganho de peso e a glicemia como mecanismo indireto da inibição da DPP-IV, prevenindo a obesidade e as doenças cardiovasculares.

Além disso, os efeitos benéficos do hidrolisado proteico no ganho de peso e nas medidas de consumo alimentar, possivelmente também estão relacionados a peptídeos parentais à fitohemaglutinina, α e β faseolamina e aos inibidores de α -amilase 1 e 2 identificados no hidrolisado proteico utilizado na presente pesquisa (ALVES et al., 2016ab). Esses peptídeos atuam estimulando a secreção de colecistocinina (CCK) nas células enteroendócrinas, hormônio intestinal que estimula a saciedade e reduz a ingestão alimentar (MCCRORY et al., 2010; SUFIAN et al., 2007, 2011) e regulam o apetite por mecanismo de redução da absorção de glicose pela produção de hormônios anoréxicos (BAINTNER et al., 2003; FANTINI et al., 2009; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015).

A redução da hipercolesterolemia no grupo HFCD-PH pode estar relacionada com a presença de peptídeos no hidrolisado proteico com efeito de reduzir a absorção de colesterol, como observados nos peptídeos bioativos do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) (MARQUES et al., 2015ab). Os peptídeos com ação hipocolesterolêmica podem inibir a solubilização micelar do colesterol, provavelmente por interagirem hidrofobicamente com o lipídio, reduzindo o risco de hipercolesterolemia e de doenças

cardiovasculares (HAYAT et al., 2014; LUNA-VITAL et al., 2015; MARQUES et al., 2015ab). O tratamento com hidrolisado proteico não aumentou as concentrações de umidade e a excreção de lipídios nas fezes, provavelmente porque esse grupo não consumiu fibras solúveis na sua dieta, componentes com efeito de aumentar a retenção de água e a excreção de lipídios nas fezes (SCHNEEMAN, 1999, 2001; JENKINS et al., 2006; ANDERSON et al., 2009; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2012).

A capacidade antioxidante total (CAT) é um biomarcador utilizado para avaliar o efeito de intervenções nutricionais com alimentos fonte de compostos bioativos na prevenção de doenças (KUSANO; FERRARI, 2008). O aumento da CAT é dependente do tipo de alimento, tempo de intervenção e da concentração de antioxidantes nos alimentos utilizados na intervenção nutricional (KUSANO; FERRARI, 2008), e também é responsivo ao aumento das defesas antioxidantes diante de situações de estresse oxidativo e processo inflamatório (FERRARI; FERRARI, 2011; FERRARI, 2012; WANG et al., 2014). No fígado dos animais não houve diferença na CAT entre os grupos experimentais. No entanto, observou-se aumento da CAT no soro dos animais do controle HFCD e dos grupos intervenções, possivelmente em função do aumento das respostas dos mecanismos antioxidantes para reduzir a peroxidação lipídica e o processo inflamatório provocado pelo consumo da dieta HFCD (FERRARI; FERRARI, 2011; FERRARI, 2012; WANG et al., 2014) e pelo consumo de compostos fenólicos pelos grupos HFCD-WF e HFCD-PH (CAO et al., 1998).

O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica gerado pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos (CHERUBINI et al., 2005; SPICKETT et al., 2010) e é considerado um biomarcador do estresse oxidativo (FRANÇA et al., 2013). O estresse oxidativo (MDA) no fígado não diferiu entre os grupos de animais, porém os grupos controles (AIN-93M e HFCD) apresentaram as maiores concentrações de MDA no soro e os tratamentos dos grupos HFCD-WF e HFCD-PH com farinha integral e com hidrolisado proteico de feijão foram eficazes em atenuar a peroxidação lipídica no soro.

Apesar da peroxidação lipídica no grupo AIN-93M ser semelhante ao controle HFCD, a resposta antioxidante no grupo controle normal também foi aumentada em relação ao controle hipercolesterolêmico, pois a atividade e expressão da superóxido dismutase (SOD) e a atividade da catalase foram maiores no grupo que consumiu dieta

normal. As enzimas antioxidantes SOD, catalase e glutathione peroxidase (GPx) são os primeiros mecanismos de defesa antioxidante do organismo e têm a função de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o estresse oxidativo (RIBEIRO et al., 2005). O aumento da defesa antioxidante enzimática no grupo AIN-93M possivelmente também foi capaz de reduzir o processo inflamatório, pois a expressão gênica de TNF- α e NFkB foram menores em relação ao grupo HFCD e a expressão gênica de marcadores anti-inflamatórios (IL-10 e PPAR α) foi maior nos animais AIN-93M em comparação a todos os grupos experimentais. Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes foi suficiente para reduzir os efeitos deletérios da peroxidação lipídica no grupo AIN-93M, uma vez que a expressão gênica de HSP72, chaperona responsiva a danos oxidativos (MAYER; BUKAU, 2005; RODRIGUEZ et al., 2006), não foi significativa para esses animais.

A peroxidação lipídica no soro do grupo HFCD não foi atenuada, pois observou-se redução da atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes (SOD e catalase) nesse grupo em relação ao grupo controle normal (AIN-93M), possivelmente porquê o consumo de dieta hipercolesterolêmica e hiperlipídica suprime a atividade das enzimas do mecanismo de defesa antioxidante do organismo (DHIBI et al., 2011; SOUR et al., 2015). Em consequência do aumento do estresse oxidativo no soro do grupo HFCD houve a ativação do processo inflamatório, pois observou-se o aumento da expressão gênica de TNF- α , citocina inflamatória responsável pelo início e manutenção da resposta inflamatória ao estresse oxidativo (BELARBI et al., 2012), e da via inflamatória do NFkB (CAI et al., 2005; SU et al., 2015) no grupo HFCD.

Além disso, no grupo controle HFCD houve redução da expressão gênica de IL-10, citocina anti-inflamatória que previne a inflamação inibindo a síntese de citocinas como o interferon gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e TNF α (BARRAT et al. 2002; HADDAD; FAHLMAN, 2002; IYER; CHENG, 2012), e de PPAR α , regulador transcricional do metabolismo lipídico, biogênese mitocondrial e da defesa antioxidante no fígado (ABDELMEGEED et al., 2010; KIM; YANG, 2013). Diante do processo inflamatório, a expressão gênica de HSP72 aumentou no fígado dos animais controle HFCD em relação aos demais grupos experimentais. A HSP72 faz parte da família de chaperonas HSP70 (*Heat Shock Proteins*), essas proteínas compõem o sistema de defesa contra danos oxidativos e atuam suprimindo as interações inadequadas de proteínas,

auxiliando na síntese, estruturação final e translocação intracelular de proteínas resintetizadas (MAYER; BUKAU, 2005; RODRIGUEZ et al., 2006), contribuindo na manutenção da homeostase e evitando a apoptose celular (TANG et al., 2007). Essa resposta por sua vez, resultou no aumento da CAT do soro dos animais HFCD, pois alguns estudos demonstram que a exposição prolongada ao estresse oxidativo e o aumento da expressão gênica de HSP72 estão relacionados com o aumento da CAT em animais (FERRARI; FERRARI, 2011; FERRARI, 2012; WANG et al., 2014).

O aumento da CAT e da atividade da SOD nos grupos que receberam intervenções com farinha integral de feijão (HFCD-WF) e com hidrolisado proteico de feijão (HFCD-PH) reduziram o estresse oxidativo no soro desses animais, pois as concentrações de MDA foram reduzidas em relação aos grupos controles (AIN-93M e HFCD). A capacidade antioxidante das intervenções do presente estudo pode ser explicada por dois mecanismos prováveis. Os compostos fenólicos da farinha integral e do hidrolisado proteico de feijão possivelmente neutralizaram os radicais livres, evitando o início e a propagação da peroxidação lipídica e estimularam o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (LÜ et al., 2010). E a digestão gastrointestinal da farinha de feijão pode ter gerado sequências de peptídeos com aminoácidos (tirosina, triptofano, metionina, lisina, cisteína e histidina) capazes de estabilizar moléculas por meio da doação de prótons ou hidrogênios e de estimular a atividade das enzimas antioxidantes (SARMADI; ISMAIL, 2010; LUNA-VITAL et al., 2015). Esse penúltimo mecanismo foi comprovado em modelo *in vitro* de aterosclerose (ALVES et al., 2016a), pois o hidrolisado proteico de feijão Madrepérola apresentou peptídeos com atividade biológica antioxidante.

As intervenções com farinha integral e com hidrolisado proteico de feijão nos grupos HFCD-WF e HFCD-PH apresentaram efeito anti-inflamatório, pois a expressão gênica de TNF- α foram semelhantes ao grupo controle normal (AIN-93M) e os tratamentos atenuaram a expressão do NF κ B. Dessa forma, a regulação transcricional do estresse oxidativo pelo receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α) não foi ativada nos camundongos dos grupos HFCD-WF e HFCD-PH. Essa resposta anti-inflamatória provavelmente ocorreu em função das intervenções terem potencializado os mecanismos antioxidantes, anteriormente discutidos, nos animais.

6.5 CONCLUSÃO

A farinha integral e o hidrolisado proteico de feijão atenuaram o estresse oxidativo e a inflamação decorrentes do consumo da dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. Ambas as intervenções reduziram a glicemia, a hipercolesterolemia, a peroxidação lipídica, aumentaram a atividade enzimática antioxidante e inibiram o processo inflamatório. Além destes efeitos, a farinha integral de feijão foi capaz de melhorar a excreção de umidade e lipídios nas fezes dos camundongos, enquanto o hidrolisado proteico de feijão foi benéfico em relação às medidas biométricas e de consumo alimentar. Os efeitos positivos observados para as intervenções da presente pesquisa são, possivelmente, resultado da presença de catequina e kaempferol 3-glucoside na farinha integral de feijão e no hidrolisado proteico, e também pela atividade de peptídeos bioativos gerados pela digestão gastrointestinal dos produtos de feijão. Portanto, a farinha integral e o hidrolisado proteico de feijão são eficazes na redução de fatores de risco para as doenças cardiovasculares.

7 CONCLUSÃO GERAL

O armazenamento por seis meses aumentou o conteúdo de amido resistente e reduziu a capacidade antioxidante dos genótipos crus avaliados, independente das características de resistência ou propensão dos grãos ao escurecimento. Portanto, a qualidade nutricional dessa leguminosa foi melhorada após seis meses de armazenamento, em temperatura ambiente, e, embora a capacidade antioxidante tenha sido reduzida, os feijões avaliados apresentaram em média maior capacidade de reduzir os radicais livres em relação a outros genótipos.

A farinha integral e o hidrolisado proteico de feijão atenuaram o estresse oxidativo e a inflamação decorrentes do consumo da dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. Ambas as intervenções apresentaram efeito hipoglicemiante, hipocolesterolêmico, antioxidante e anti-inflamatório, pois reduziram a glicemia, o colesterol total, o malondialdeído no soro, aumentaram a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase e inibiram a ativação da via inflamatória do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB). Além destes efeitos, a farinha integral de feijão foi capaz de melhorar a excreção de umidade e lipídios nas fezes dos camundongos, enquanto o hidrolisado proteico de feijão foi benéfico em relação às medidas biométricas e de consumo alimentar.

A redução dos fatores de risco para as doenças cardiovasculares possivelmente resultaram da presença de catequina e kaempferol 3-glucoside na farinha integral de feijão e no hidrolisado proteico, e também pela atividade de peptídeos bioativos gerados pela digestão gastrointestinal dos produtos de feijão. Resultados em consonância com as observações dos estudos *in vitro* realizado por Alves e colaboradores (2017ab). Portanto, o consumo do feijão e de seu hidrolisado proteico são capazes de modular a hipercolesterolemia e seus efeitos negativos em animais.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O armazenamento por seis meses influenciou negativamente a capacidade antioxidante dos genótipos de feijão carioca. Sugere-se que sejam investigadas as concentrações e o perfil de outros compostos bioativos nos feijões com e sem armazenamento, para que se possa avaliar se o armazenamento tem efeito de degradar ou dificultar a extração dos fitoquímicos bioativos.

Efeitos de redução de medidas biométricas, consumo alimentar, glicemia e de colesterol total foram observadas nos animais que consumiram hidrolisado proteico de feijão. Diante das evidências de que o hidrolisado proteico de feijão BRSMG Madrepérola apresenta sequências de peptídeos bioativos com atividade de inibir a enzima *dipeptidyl peptide protease IV* (DPP-IV), sugere-se que o mecanismo da regulação da fome e da saciedade seja investigado nos tecidos dos animais do presente estudo experimental. Além disso, sugere-se a realização de outros estudos com esse modelo de ensaio biológico utilizando-se outros genótipos de feijão e seus hidrolisados proteicos.

9 REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED, M. A.; MOON, K. H.; HARDWICK, J. P.; GONZALEZ, F. J.; SONG, B. J. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- α in fasting-mediated oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 6, p. 767-778, 2010.
- ABELES, F. B.; BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v. 95, n. 1, p. 269-273, 1991.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AJILA, C. M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G.; RAO, U. J. S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v.105, n. 3, p. 982 - 88, 2007.
- ALMEIDA, L. D. A.; LEITÃO FILHO, H. F.; MIYASAKA, S. Características do feijão carioca, um novo cultivar. **Bragantia**, Campinas, v. 30, p. 33-38, 1971.
- ALVES, N. E. G.; MEJÍA, E. G.; VASCONCELOS, C. M.; BASSINELLO, P. Z.; MARTINO, H. S. D. Postharvest storage of Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) did not impair inhibition of inflammation in lipopolysaccharide-induced human THP-1 macrophage-like cells. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 154-166, 2016a.
- ALVES, N. E. G.; VASCONCELOS, C. M.; BASSINELLO, P. Z.; MEJÍA, E. G.; MARTINO, H. S. D. Digested protein isolate from fresh and stored Carioca beans reduced markers of atherosclerosis in oxidized LDL-induced THP-1 macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 97-111, 2016b.
- ANANDHI, R.; THOMAS, P. A; GERALDINE, P. Evaluation of the anti-atherogenic potential of chrysin in Wistar rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 385, n. 1-2, p. 103-113, 2014.
- ANDERSON, J. W.; BAIRD, P.; DAVIS, R. H.; FERRERI, S.; KNUDTSON, M.; KORAYM, A.; WATERS, V.; WILLIAMS, C. L. Health benefits of dietary fiber. **Nutrition reviews**, v. 67, n. 4, p. 188-205, 2009.

ANDRADE, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ANDRADE, G. F.; ALMEIDA, C. D. G.; ESPESCHIT, A. C. R.; SOUZA DANTAS, M. I.; ANJOS BENJAMIN, L.; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 145, 2013.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 20 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2016.

BAINTNER, K.; KISS, P.; PFÜLLER, U.; BARDOCZ, S.; PUSZTAI, A. Effect of orally and intraperitoneally administered plant lectins on food consumption of rats. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 90, n. 2, p. 97-107, 2003.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1066–1071, 1997.

BARRAT, F. J.; CUA, D. J.; BOONSTRA, A.; RICHARDS, D. F.; CRAIN, C.; SAVELKOUL, H. F.; WAAL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; HAWRYLOWICZ, C. M.; O’GARRA, A. In vitro generation of interleukin 10–producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)– and Th2-inducing cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 5, p. 603–616, 2002.

BARROS, M.; PRUDENCIO, S. H. Physical and chemical characteristics of common bean varieties. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 751-762, 2016.

BASSINELLO, P. Z.; COBUCCI, R. M. A.; ULHÔA, V. G.; MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J. Aceitabilidade de três cultivares de feijoeiro comum. **Comunicado técnico 66. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás**, p.5-6. 2003.

BATISTA, K. A.; PRUDÊNCIO, S. H.; FERNANDES, K. F. Wheat Bread Enrichment with Hard-to-Cook Bean Extruded Flours: Nutritional and Acceptance Evaluation. **Journal of food science**, v. 76, n. 1, p. 108-113, 2011.

BAUERFEIND, J. C. Tocopherols in foods. In (Ed.). **Vitamin E: A Comprehensive Treatise**: L.J. Machin, 1980. Tocopherols in foods, pp. 91–169.

BEEBE, S. E. Common bean breeding in the tropics. **Plant Breeding Reviews**, v. 36, p. 357-426, 2012.

BEEBE, S. E.; RAO, I. M.; DEVI, M. J.; POLANIA, J. Common beans, biodiversity, and multiple stresses: challenges of drought resistance in tropical soils. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 7, p. 667-675, 2014.

BELARBI, K.; JOPSON, T.; TWEEDIE, D.; ARELLANO, C.; LUO, W.; GREIG, N. H.; ROSI, S. TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 23, 2012.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Flavonol glycosides from Montcalm dark red kidney bean: Implications for the genetics of seed coat color in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4079-4082, 1999.

BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1296–1307, 2011.

BIRT, D. F.; BOYLSTON, T.; HENDRICH, S.; JANE, J.-L.; HOLLIS, J.; LI L.; MCCLELLAND, J.; MOORE, S., PHILLIPS, G. J.; ROWLING, M.; SCHALINSKE, K.; SCOTT, M. P.; WHITLEY, E. M. Resistant starch: promise for improving human health. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 6, p. 587-601, 2013.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Bioavailability of amino acids in beans (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 41, n. 1, p. 38-52, 1991.

BLOEMEN, J. G.; VENEMA, K.; VAN DE POLL, M. C.; DAMINK, S. W. O.; BUURMAN, W. A.; DEJONG, C. H. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657–661, 2009.

BLOIS, M. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 3–14, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGANTINI, C. Alguns aspectos do armazenamento de sementes e grãos de feijão. **Embrapa Arroz e Feijão. Documentos**, 2005.

BRASIL. Boletim Técnico: Biotecnologia Agropecuária. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p.73. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Projeções do agronegócio: Brasil 2014/15 a 2024/25 - Projeções de Longo Prazo**. Brasília, DF, 2015b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf>. Acesso em 4 de maio de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Culturas - Feijão**. Brasília, DF, 2015a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em 15 de março de 2016.

BROUGHTON, W. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.

BUTT, M. S.; BATOOL, R. Nutritional and functional properties of some promising legume protein isolates. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 4, p. 373-379, 2010.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F.; MELENDEZ, P. A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. **Nature medicine**, v. 11, n. 2, p. 183-190, 2005.

CAM, A.; DE MEJIA, E. G. Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease. **Molecular nutrition & food research**, v.56, n.1, p.53-66, 2012.

CÂMARA, C. R. S.; URREA, C. A.; SCHLEGEL, V. Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional food: Implications on human health. **Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 90-111, 2013.

CAMPOS-VEGA, R.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G.; GUEVARA-OLVERA, B. L.; OOMAH, B. D.; LOARCA-PIÑA, G. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). **Food research international**, v. 43, n. 4, p. 1057-1064, 2010.

CAMPOS-VEGA, R.; OOMAH, B. D.; LOARCA-PIÑA, G.; VERGARA-CASTAÑEDA, H. A. Common Beans and Their Non-Digestible Fraction: Cancer Inhibitory Activity—An Overview. **Foods**, v. 2, n. 3, p. 374–392, 2013.

CAO, G.; RUSSELL, R. M.; LISCHNER, N.; PRIOR, R. L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2383-2390, 1998.

CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6975-6980, 2002.

CARNEIRO, J. E. S.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P.; PAULA JÚNIOR, T. J.; DEL PELOSO, M. J.; MELO, L. C.; PEREIRA H. S.; PEREIRA FILHO, I. A.; MARTINS, M.; VIEIRA, R. F.; MARTINS, F. A. D.; COELHO, M. A. O.; CARNEIRO, P. C. S.; MOREIRA, J. A. A.; SANTOS, J. B.; FARIA, L. C.; COSTA, J. G. C.; TEIXEIRA, H. BRSMG Madrepérola: common bean cultivar with late-darkening Carioca grain. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 281-284, 2012.

CARON, J.; DOMENGER, D.; BELGUESMIA, Y.; KOUACH, M.; LESAGE, J.; GOOSSENS, J. F.; DHULSTER, P.; RAVALLEC, R.; CUDENNEC, B. Protein digestion and energy homeostasis: How generated peptides may impact intestinal hormones?. **Food Research International**, v. 88, p. 310-318, 2016.

CEUA - ENSP. Comitê de Ética em Pesquisa. **Escola Nacional de Saúde Pública**. Disponível em: <<http://andromeda.ensp.fiocruz.br/etica/>>. Acesso em 5 de outubro de 2015.

CEUA - UnB. Estimativa de “N”. **Comissão de Ética no Uso de Animais**. Disponível em: <<http://ceuaunb.org/estimativa-de-n/>>. Acesso em 5 de outubro de 2015.

CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; GRANADOS, O.; TORRE-VILLALVAZO, I.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; TORRES, N.; PALACIOS-GONZÁLEZ, B.; TOVAR, A. R. Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 6, p. 886-899, 2014.

CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Effect of flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors. **Plant Foods For Human Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 416-423, 2013.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M. C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 7, p. 841-852, 2005.

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

CHOU, C.; WU, M.; NURTAMA, B.; LIN, J. Effects of different heating treatment and storage time on formation of resistant starch from potato starch. **Kasetsart Journal: Natural Sciences**, v. 44, n. 5, p. 935-942, 2010.

CHUNG, H. J.; LIU, Q.; PAULS, K. P.; FAN, M. Z.; YADA, R. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. **Food Research International**, v. 41, n. 9, p. 869–875, 2008.

COELHO, S. R. M., PRUDÊNCIO, S. H., CHRIST, D.; SAMPAIO, S. C. Storage-induced changes in protein interactions and protein solubility in common beans. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, n. 3&4, p. 44-48, 2011.

COELHO, S. R. M.; PRUDÊNCIO, S. H.; NÓBREGA, L. H. P.; LEITE, C. F. R. Alterações no tempo de cozimento e textura dos grãos de feijão comum durante o armazenamento. **Ciência e agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 539-544, 2009.

COLINA-COCA, C.; RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; FONTECHA, J.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; DE ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C. Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. **Food Research International**, v. 64, p. 546-552, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2016/17 - Oitavo levantamento**. Brasília: Conab, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_12_10_37_57_boletim_graos_mai_2017.pdf>. Acesso em 18 de junho de 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária: volume 3 - Safra 2015/2016 Produtos de Verão**. Brasília: Conab, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_24_11_44_50_perspectivas_agropecuaria_2015-16_-_produtos_verao.pdf>. Acesso em 4 de maio de 2016.

COSTA, G. E. A.; QUEIROZ-MONICI, K. S.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 327-330, 2006.

CRISTOFORI, P.; CRIVELLENTI, F.; CAMPAGNOLA, M.; PASINI, A. F.; GARBIN, U.; RIGONI, A.; TOSETTI, M.; TURTON, J.; FAUSTINELLI, I.; COMINACINI, L. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice treated with lacidipine is associated with a decreased susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 85, n. 2, p. 105-114, 2004.

DARZI, J.; FROST, G. S.; ROBERTSON, M. D. Do SCFA have a role in appetite regulation?. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. 1, p. 119-128, 2011.

DE ALMEIDA COSTA, G. E.; DA SILVA QUEIROZ-MONICI, K.; REIS, S. M. P. M.; DE OLIVEIRA, A. C. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 327-330, 2006.

DE CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; BIASOTO, A. C. T.; SHAHIDI, F. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 50, p. 12159-12171, 2014.

DE LA FUENTE, M.; LOPEZ-PEDROUS, M.; ALONSO, J.; SANTALLA, M.; DE RON, A.; ALVAREZ, G.; ZAPATA, C. In-depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 315–325, 2012.

DEL PELOSO, M. J.; MELO, L. C.; FARIA, L. C.; COSTA, J. G. C.; RAVA, C. A.; CARNEIRO, G. E. S.; SOARES, D. M.; DÍAZ, J. L. C.; ABREU, A. F. B.; FARIA, J. C.; SARTORATO, A.; SILVA, H. T.; BASSINELLO, P. Z.; ZIMMERMANN, F. J. P.

BRS Pontal: nova cultivar de feijoeiro comum de tipo de grão carioca com alto potencial produtivo. **Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico**, 2003.

DHIBI, M.; BRAHMI, F.; MNARI A.; HOUAS Z.; CHARGUI I.; BCHIR L.; GAZZAH, N.; ALSAIF, M. A.; HAMMAMI, M. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 65-76, 2011.

DIAS, D. M.; DE CASTRO MOREIRA, M. E.; GOMES, M. J. C.; LOPES TOLEDO, R. C.; NUTTI, M. R.; PINHEIRO SANT'ANA, H. M.; MARTINO, H. S. D. Rice and bean targets for biofortification combined with high carotenoid content crops regulate transcriptional mechanisms increasing iron bioavailability. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9683-9696, 2015.

DÍAZ-BATALLA, L.; WIDHOLM, J. M.; FAHEY, G. C.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; PAREDES-LÓPEZ, O. Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2045-2052, 2006.

DUEÑAS, M.; SARMENTO, T.; AGUILERA, Y.; BENITEZ, V.; MOLLÁ, E.; ESTEBAN, R. M.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 72-78, 2016.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Arroz e Feijão. **Catálogo de cultivares de feijão comum: safra 2016-2017**. Brasília: Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/154713/1/catalogoFeijao-safra2016-2017-web1.pdf>>. Acesso em 18 de junho de 2017.

ENG, J. Sample Size Estimation: How Many Individuals Should Be Studied?¹. **Radiology**, v. 227, n. 2, p. 309-313, 2003.

ENGEL, M.; HOFFMANN, T.; MANHART, S.; HEISER, U.; CHAMBRE, S.; HUBER, R.; DEMUTH H. U.; BODE, W. Rigidity and flexibility of dipeptidyl

peptidase IV: crystal structures of and docking experiments with DPIV. **Journal of molecular biology**, v. 355, n. 4, p. 768-783, 2006.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal Of Clinical Nutrition**, v. 46, p. S33-50, 1992.

EYARU, R.; SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J. Effect of various processing techniques on digestibility of starch in Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) and two varieties of peas (*Pisum sativum*). **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 956-962, 2009.

FANTINI, N.; CABRAS, C.; LOBINA, C.; COLOMBO, G.; GESSA, G. L.; RIVA, A.; DONZELLI, F.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; CARAI, M. A. M. Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9316-9323, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The statistics division of the FAO. FAOSTAT Food Balance Sheets**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>>. Acesso em 18 de junho de 2017a.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The statistics division of the FAO. FAOSTAT Crops**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 18 de junho de 2017b.

FAO/WHO. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organization technical report series**, n. 935, p. 1-265, 2007.

FAO/WHO. Protein quality evaluation: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. **World Health Organization technical report series**, p. 4-8, 1991.

FARIA, L. C. D.; COSTA, J. G. C. D.; RAVA, C. A.; PELOSO, M. J. D.; MELO, L. C.; CARNEIRO, G. E. D. S.; SOARES, D. M.; DÍAZ, J. L. C.; FÁTIMA, A. D.; ABREU, B.; FARIA, J. C. D.; SARTORATO, A.; SILVA, H. T. D.; BASSINELLO, P. Z.; ZIMMERMANN, F. J. P. "BRS Requite": new common bean Carioca cultivar with delayed grain darkness. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.366-368. 2004.

FEREGRINO-PEREZ, A. A.; PIÑOL-FELIS, C.; GOMEZ-ARBONES, X.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; CAMPOS-VEGA, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; LOARCA-PIÑA, G. A non-digestible fraction of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induces cell cycle arrest and apoptosis during early carcinogenesis. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 248-254, 2014.

FERRARI, C. K. B. Effects of xenobiotics on total antioxidant capacity. **Interdisciplinary toxicology**, v. 5, n. 3, p. 117-122, 2012.

FERRARI, G. S. L.; FERRARI, C. K. B. Exercise modulation of total antioxidant capacity (TAC): towards a molecular signature of healthy aging. **Frontiers in Life Science**, v. 5, n. 3-4, p. 81-90, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 43, n.1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, C. S.; PIEDADE, M. T. F.; TINÉ, M. A. S.; ROSSATTO, D. R.; PAROLIN, P.; BUCKERIDGE, M. S. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. **Annals of Botany**, p. 1.111-1.119, 2009.

FONTANARI, G. G.; BATISTUTI, J. P.; CRUZ, R. J.; SALDIVA, P. H. N.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1521-1526, 2012.

FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; ALVES, A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE jornal português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FRARY, C. D.; JOHNSON, R. K. Energia. In (Ed.): **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**: MAHAN, L. K. e ESCOTT-STUMP, S. K., São Paulo: Rocca, 2005. Energia p.20-34.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-Lowering Properties of Whole Cowpea Seed and Its Protein Isolate in Hamsters. **Journal of food science**, v. 73, n. 9, p. H235-H240, 2008.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KYRIAKIDIS, N. B.; MARGARIS, I. Phytase–phytate–pectin hypothesis and quality of legumes cooked in calcium solutions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 2, p. 355-361, 2008.

GALLAGHER, E. J.; LEROITH, D.; KARNIELI, E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. **Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine**, v. 77, n. 5, p. 511-523, 2010.

GARCIA, E.; FILISETTI, T. M. C. C.; UDAETA, J. E. M.; LAJOLO-FM. Hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of phenolic compounds and pectates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2110-2116, 1998.

GARCÍA-LAFUENTE A.; MORO C.; MANCHÓN N.; GONZALO-RUIZ A.; VILLARES A.; GUILLAMÓN E.; ROSTAGNO M.; MATEO-VIVARACHO L. *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food Chemistry**, v. 161, p. 216-223, 2014.

GARCÍA-ROSAS, M.; BELLO-PÉREZ, A.; YEE-MADEIRA, H.; RAMOS, G.; FLORES-MORALES, A.; MORA-ESCOBEDO, R. Resistant starch content and structural changes in maize (*Zea mays*) tortillas during storage. **Starch - Stärke**, v. 61, n. 7, p. 414–421, 2009.

GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 53, n. 1, p. 131-146, 1997.

GRANGER, D. N.; RODRIGUES, S. F.; YILDIRIM, A.; SENCHENKOVA, E. Y. Microvascular responses to cardiovascular risk factors. **Microcirculation**, v. 17, n. 3, p. 192-205, 2010.

GUO, H.; KOUZUMA, Y.; YONEKURA, M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. **Food Chemistry**, v. 113, p. 238–245, 2009.

GURAYA, H. S.; KADAN, R. S.; CHAMPAGNE, E. T. Effect of rice starch-lipid complexes on in vitro digestibility, complexing index, and viscosity. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 561-565, 1997.

HADDAD, J. J.; FAHLMAN, C. S. Redox-and oxidant-mediated regulation of interleukin-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine?. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 297, n. 2, p. 163-176, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals In Biology And Medicine**. 3th ed. Oxford University Press, 1999.

HAN, K.; FUKUSHIMA, M.; SHIMIZU, K.; KOJIMA, M.; OHBA, K.; TANAKA, A.; SHIMADA, K.; SEKIKAWA, M.; NAKANO, M. Resistant starches of beans reduce the serum cholesterol concentration in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 49, n. 4, p. 281-286, 2003.

HAN, K.; SEKIKAWA, M.; SHIMADA, K. I.; SASAKI, K.; OHBA, K.; FUKUSHIMA, M. Resistant starch fraction prepared from kintoki bean affects gene expression of genes associated with cholesterol metabolism in rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 8, p. 787-792, 2004.

HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 5, p. 580-592, 2014.

HEIN, T. W.; SINGH, U.; VASQUEZ-VIVAR, J.; DEVARAJ, S.; KUO, L.; JIALAL, I. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 1, p. 61-68, 2009.

HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, D.; MENDOZA-SÁNCHEZ, M.; HERNÁNDEZ-MONTIEL, H. L.; GUZMÁN-MALDONADO, H. S.; LOARCA-PIÑA, G. F.; SALGADO, L. M.; REYNOSO-CAMACHO, R. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris*) protect against β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant foods for human nutrition**, v. 68, n. 2, p. 207-212, 2013.

HETTINGER, A. M.; ALLEN, M. R.; ZHANG, B. R.; GOAD, D. W.; MALAYER, J. R.; GEISERT, R. D. Presence of the acute phase protein, bikunin, in the endometrium of gilts during estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 2, 507-513, 2001.

HOHLBERG, A. I.; STANLEY, D. W. Hard-to-cook defect in black beans. Protein and starch considerations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 571-576, 1987.

HOSSAIN, M. K.; DAYEM, A. A.; HAN, J.; YIN, Y.; KIM, K.; SAHA, S. K.; YANG, G.; CHOI, H. Y.; CHO, S. Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 569, 2016.

HUANG, Y.; CHEN, L.; FENG, L.; GUO, F.; LI, Y. Characterization of total phenolic constituents from the stems of *Spatholobus suberectus* using LC-DAD-MSn and their inhibitory effect on human neutrophil elastase activity. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7549-7556, 2013.

ISWALDI, I.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food research international**, v. 50, n. 1, p. 77-84, 2013.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 32, n. 1, 2012.

JAFARI, M.; RAJABZADEH, A. R.; TABTABAEI, S.; MARSOLAIS, F.; LEGGE, R. L. Physicochemical characterization of a navy bean (*Phaseolus vulgaris*) protein fraction produced using a solvent-free method. **Food Chemistry**, v. 208, p. 35-41, 2016.

JELLINGER, P. S. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. **Clinical Cornerstone**, v. 8, p. S30-S42, 2007.

JENKINS, D. J.; KENDALL, C. W.; FAULKNER, D. A.; NGUYEN, T.; KEMP, T.; MARCHIE, A.; WONG, J. M.; SOUZA, R.; EMAM, A.; VIDGEN, E.; TRAUTWEIN, E. A.; LAPSLEY, K. G.; HOLMES, C.; JOSSE, R. G.; LEITER, L. A.; CONNELLY, P. W.; SINGER, W. Assessment of the longer-term effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods in hypercholesterolemia. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 3, p. 582-591, 2006.

JORIS, I.; ZAND, T.; NUNNARI, J. J.; KROLIKOWSKI, F. J.; MAJNO, G. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. **The American Journal of Pathology**, v.113, n.3, p.341-358, 1983.

JOURNI, M.; HAMMOUDA, H.; TRABELSI-AYADI, M.; CHÉRIF, J. K. Quantitative determination and identification of phenolic compounds of three Tunisian legumes: *Vicia faba*, *Lens culinaris* and *Phaseolus vulgaris*. **Advances in Chemistry and Biochemistry Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1-12, 2015.

JUNK-KNIEVEL, D. C.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Slow Darkening in Pinto Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seed Coats Is Controlled by a Single Major Gene. **Crop science**, v. 48, n. 1, p. 189-193, 2008.

KADAM, S. S.; SALUNKHE, D. K. Minerals and vitamins. In (Ed.). **Handbook of world food legumes**: Boca Raton - CRC Press, 1989. Minerals and vitamins, pp. 117–121 (D. K. Salunkhe).

KAHLON, T. S.; SMITH, G. E.; SHAO, Q. In vitro binding of bile acids by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo*), bengal gram (*Cicer arietinum*) and moth bean (*Phaseolus aconitifolius*). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 241-246, 2005.

KEYS, A.; FIDANZA, F.; KARVONEN, M. J.; KIMURA, N.; TAYLOR, H. L. Indices of relative weight and obesity. **Journal of chronic diseases**, v. 25, n. 6-7, p. 329-343, 1972.

KIGEL, J. Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v.3, n.4, p. 205-209, 1999.

KIM, S.; HONG, J.; JEON, R.; KIM, H. S. Adzuki bean ameliorates hepatic lipogenesis and proinflammatory mediator expression in mice fed a high-cholesterol and high-fat diet to induce nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Research**, v. 36, n. 1, p. 90-100, 2016.

KIM, T.; YANG, Q. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. **World Journal of Cardiology**, v. 5, n. 6, p. 164-174, 2013.

KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309-1323, 2003.

KOSIŃSKA, A.; KARAMAĆ, M.; PENKACIK, K.; URBALEWICZ, A.; AMAROWICZ, R. Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (*Vicia faba* Major) yield soluble and non-soluble complexes. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 2, p. 213-222, 2011.

KURTEL, H.; RODRIGUES, S. F.; YILMAZ, C. E.; YILDIRIM, A.; GRANGER, D. N. Impaired vasomotor function induced by the combination of hypertension and hypercholesterolemia. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 7, n. 1, p. 14-23, 2013.

KUSANO, C.; FERRARI, B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2008.

KUTOŠ, T.; GOLOB, T.; KAČ, M.; PLESTENJAK, A. Dietary fibre content of dry and processed beans. **Food Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 231–235, 2003.

LAMMI, C.; ZANONI, C.; ARNOLDI, A. IAVPGEVA, IAVPTGVA, and LPYP, three peptides from soy glycinin, modulate cholesterol metabolism in HepG2 cells through the activation of the LDLR-SREBP2 pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 469-478, 2015.

LEE, H. S.; NAM, Y.; CHUNG, Y. H.; KIM, H. R.; PARK, E. S.; CHUNG, S. J.; KIM, J. H.; SOHN, U. D.; KIM, H. C.; OH, K. W.; JEONG, J. H. Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice. **Life sciences**, v. 118, n. 1, p. 7-14, 2014.

LESZCZYNSKI, W. Resistant starch—classification, structure, production. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 13, n. 54, p. 37-50, 2004.

LIU, H. J.; CHANG, B. Y.; YAN, H. W.; YU, F. H.; LU, X. X. Determination of amino acids in food and feed by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and reversed-phase liquid chromatographic separation. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 3, p. 736-744, 1995.

LIU, K.; BOURNE, M. C. Cellular, biological, and physicochemical basis for the hard-to-cook defect in legume seeds. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 263-298, 1995.

LIU, K.; PHILLIPS, R. D.; HUNG, Y. C. Development of hard-to-cook defect in cowpeas: role of pectin methylesterase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 40, n. 6, p. 949-952, 1992.

LÜ, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUNA-VITAL, D. A.; MOJICA, L.; MEJÍA, E. G.; MENDOZA, S.; LOARCA-PIÑA, G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. **Food Research International**, v. 76, p. 39-50, 2015.

MANGALA, S. L.; UDAYASANKAR, K.; THARANATHAN, R. N. Resistant starch from processed cereals: the influence of amylopectin and non-carbohydrate constituents in its formation. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 391-396, 1999.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**, CRC Press Boca Raton FL. Pyrogallol autooxidation, p.243-247, 1985.

MARLES, M. A. S.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Polyphenol oxidase activity and differential accumulation of polyphenolics in seed coats of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) characterize postharvest color changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7049-7056, 2008.

MARQUES, M. R.; FONTANARI, G. G.; PIMENTA, D. C.; SOARES-FREITAS, R. M.; ARÊAS, J. A. G. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food Research International**, v. 77, p. 43-48, 2015a.

MARQUES, M. R.; FREITAS, R. A. M. S.; CARLOS, A. C. C.; SIGUEMOTO, É. S.; FONTANARI, G. G.; ARÊAS, J. A. G. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food chemistry**, v. 168, p. 288-293, 2015b.

MARTÍN-CABREJAS, M. A.; ESTEBAN, R. M.; PEREZ, P.; MAINA, G.; WALDRON, K. W. Changes in physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during long-term storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3223-3227, 1997.

MARTINO, H. S. D.; BIGONHA, S. M.; CARDOSO, L. M.; ROSA, C. O. B.; COSTA, N. M. B.; CÁRDENAS, L. L. A. R.; RIBEIRO, S. M. R. Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health. In: (Ed.). **Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds**: American Chemical Society, v. 1109, 2012. Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health, p.233-258. (ACS Symposium Series).

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and molecular life sciences**, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005.

MCCRORY, M. A.; HAMAKER, B. R.; LOVEJOY, J. C.; EICHELSDOERFER, P. E. Pulse consumption, satiety, and weight management. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 1, n. 1, p. 17-30, 2010.

MEGÍAS, C.; YUST, M.; PEDROCHE, J.; LQUARI, H.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus*

annuus L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1928-1932. 2004.

MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. **BioFactors**, v. 21, n. 1-4, p. 55–61, 2004.

MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; COSTA, J. G. C.; CABRERA DIAZ, J. L.; WENDLAND, A.; CARVALHO, H. W. L.; COSTA, A. F.; ALMEIDA, V. M.; MELO, C. L. P.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; POSSE, S. C. P.; FARIA, J. C.; SOARES, J.; CARGNIN, A.; ABREU, A. F. B.; MOREIRA, J. A. A.; PEREIRA FILHO, I. A.; MARANGON, M.; GUIMARÃES, C. M.; BASSINELLO, P. Z.; BRONDANI, R. P. V.; BRAZ, A. J. B. P.; MAGALDI, M. C. S. BRS Estilo - Cultivar de Feijão Carioca com Grãos Claros, Arquitetura Ereta e Alto Potencial Produtivo. **Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico**, 2011.

MENDEZ, M. H. M.; FERNANDES, M. L.; RODRIGUES, M. C. R.; DERIVI, S. C. N. **Tabela de composição de alimentos**, 1995.

MOJICA, L.; CHEN, K.; MEJÍA, E. G. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. **Journal of food science**, v. 80, n. 1, p. 188-198, 2015.

MOJICA, L.; MEJÍA, E. G. Characterization and comparison of protein and peptide profiles and their biological activities of improved common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 105-112, 2015.

MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, v. 69, p. 38-48, 2015.

MOREIRA, M. E. C.; PEREIRA, R. G. F. A.; DIAS, D. F.; GONTIJO, V. S.; VILELA, F. C.; MORAES, G. O. I.; GIUSTI-PAIVA, A.; SANTOS, M. H. Anti-inflammatory

effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 466–474, 2013.

NAIR, A. R.; ELKS, C. M.; VILA, J.; DEL PIERO, F.; PAULSEN, D. B.; FRANCIS, J. A blueberry-enriched diet improves renal function and reduces oxidative stress in metabolic syndrome animals: Potential mechanism of TLR4-MAPK signaling pathway. **PLoS ONE**, v.9, n.11, p.1-12, 2014.

NASAR-ABBAS, S. M.; SIDDIQUE, K. H. M.; PLUMMER, J. A.; WHITE, P. F.; HARRIS, D.; DODS, K.; D'ANTUONO, M. Faba bean (*Vicia faba* L.) seeds darken rapidly and phenolic content falls when stored at higher temperature, moisture and light intensity. **LWT e Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1703-1711, 2009.

NATAL, D. I. G.; CASTRO MOREIRA, M. E.; MILIÃO, M. S.; DOS ANJOS BENJAMIN, L.; DE SOUZA DANTAS, M. I.; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. Ubá mango juices intake decreases adiposity and inflammation in high-fat diet-induced obese Wistar rats. **Nutrition**, v. 32, n. 9, p. 1011-1018, 2016.

NELSON, R. H. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 40, n. 1, p. 195-211, 2013.

NETO, J. M. F. A.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V. Proteínas de estresse “hsp70” atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos “wistar” submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. **Brazilian Journal of Biomotricity**, v. 2, n. 3, p. 160-175, 2008.

NILSSON, A.; JOHANSSON, E.; EKSTRÖM, L.; BJÖRCK, I. Effects of a brown beans evening meal on metabolic risk markers and appetite regulating hormones at a subsequent standardized breakfast: a randomized cross-over study. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e59985, 2013.

NJOROGE, D. M.; KINYANJUI, P. K.; CHIGWEDERE, C. M.; CHRISTIAENS, S.; MAKOKHA, A. O.; SILA, D. N.; HENDRICKX, M. E. Mechanistic insight into common bean pectic polysaccharide changes during storage, soaking and thermal treatment in relation to the hard-to-cook defect. **Food Research International**, v. 81, p. 39-49, 2016.

NJOROGE, D. M.; KINYANJUI, P. K.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; MAKOKHA, A. O.; SILA, D. N.; HENDRICKX, M. E. Effect of storage conditions on pectic polysaccharides in common beans (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the hard-to-cook defect. **Food Research International**, v. 76, p. 105-113, 2015.

NUNES, F. M.; LOPES, E. S.; MOREIRA, A. S.; SIMÕES, J.; COIMBRA, M. A.; DOMINGUES, R. M. Formation of type 4 resistant starch and maltodextrins from amylose and amylopectin upon dry heating: A model study. **Carbohydrate polymers**, v. 141, p. 253-262, 2016.

OLIVEIRA, A. C. D.; QUEIROZ, K. D. 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 nutrición**, v. 51, n. 3, p. 276-283, 2001.

OSEGUERA-TOLEDO, M; MEJIA, E. G.; DIA, V. P; AMAYA-LLANO, S. Common bean hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1175–1185, 2011.

OSORIO-DÍAZ, P.; BELLO-PÉREZ, L. A.; SÁYAGO-AYERDI, S. G.; BENÍTEZ-REYES, M. D. P.; TOVAR, J.; PAREDES-LÓPEZ, O. Effect of processing and storage time on in vitro digestibility and resistant starch content of two bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 12, p. 1283-1288, 2003.

OSTLUND, R. E. J. Phytosterols and cholesterol metabolism. **Current opinion in lipidology**, v. 15, n. 1, p. 37-41, 2004.

OYENIHI, A. B.; AYELESO, A. O.; MUKWEVHO, E.; MASOLA, B. Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy. **Biomed research international**, v. 2015, p. 1-15, 2015.

OZTURK, S.; KOKSEL, H.; PERRY, K. W. N. Characterization of resistant starch samples prepared from two high-amylose maize starches through debranching and heat treatments. **Cereal chemistry**, v. 86, n. 5, p. 503-510, 2009.

PANDA, S.; KAR, A. Guggulu (*Commiphora mukul*) potentially ameliorates hypothyroidism in female mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 1, p. 78-80, 2005.

PANDA, S.; KAR, A.; PATIL, S. Soy sterols in the regulation of thyroid functions, glucose homeostasis and hepatic lipid peroxidation in mice. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1087-1092, 2009.

PEDROSA, M. M.; CUADRADO, C.; BURBANO, C.; MUZQUIZ, M.; CABELLOS, B.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; ASENSIO-VEGAS, C. Effects of industrial canning on the proximate composition, bioactive compounds contents and nutritional profile of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 166, p. 68–75, 2015.

PELLIZZON, M. A. Diet-induced atherosclerosis/hypercholesterolemia in rodent models. **Research Diets**, 2008.

PEREIRA, M. P.; TAVANO, O. L. Use of different spices as potential natural antioxidant additives on cooked beans (*Phaseolus vulgaris*) increase of DPPH radical scavenging activity and total phenolic content. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 337-343, 2014.

PIRAYESH, J. I.; MEHRALI, H. Lycopene as a carotenoid provides radioprotectant and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: An overview. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 16, n. 4, p. 386-391, 2015.

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 - 2009. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Brasil, 2010.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília, DF: AGIPLAN, 1977. 289 p.

PROLLA, I. R. D.; BARBOSA, R. G.; VEECK, A. P. L.; AUGUSTI, P. R.; SILVA, L. P. D.; RIBEIRO, N. D.; EMANUELLI, T. Cultivar, harvest year, and storage conditions affecting nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 96-102, 2010.

PUBCHEM. Estrutura do Catechin. **National Center for Biotechnology Information - Open Chemistry Database - Compounds**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9064#section=Top>>. Acesso em 12 de dezembro de 2016.

PUBCHEM. Estrutura do Kaempferol 3-glucoside. **National Center for Biotechnology Information - Open Chemistry Database - Compounds**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5316673#section=Top>>. Acesso em 12 de dezembro de 2016.

PUJOLÀ, M.; FARRERAS, A.; CASAÑAS, F. Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1034-1041, 2007.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1551-1557, 2007.

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**, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; REYNOSO-CAMACHO, R.; TEJERO, M. E.; LEÓN-GALVÁN, F.; LOARCA-PIÑA, G. Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. **Food Research International**, v. 76, p. 92-104, 2015.

RANI, P. R.; CHELLADURAI, V.; JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G.; KAVITHA-ABIRAMI, C. V. Storage studies on pinto beans under different moisture contents and temperature regimes. **Journal of stored products research**, v. 52, p. 78-85, 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. 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**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RESENDE, O.; CORRÊA, P. C.; FARONI, L. R. D. A.; CECON, P. R. Avaliação of the technological quality of the edible beans during the storage. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 517-524, 2008.

REYES-BASTIDAS, M.; REYES-FERNÁNDEZ, E. Z.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; MILÁN-CARRILLO, J.; LOARCA-PIÑA, G. F.; REYES-MORENO, C. Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Science and Technology International**, v. 16, n. 5, p. 427–434, 2010.

REYES-MORENO, C.; PAREDE-LÓPEZ, O.; GONZALEZ, E. Hard-to-cook phenomenon in common beans – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. D. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, 2005.

RICKER, W.E. Growth rates and models. In: (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, vol. VIII: Bioenergetics and Growth, 1979. Growth rates and models, p. 677-743.

RIGOTTI, A.; MARZOLO, M. P.; ULLOA, N.; GONZALEZ, O.; NERVI, F. Effect of bean intake on biliary lipid secretion and on hepatic cholesterol metabolism in the rat. **Journal Of Lipid Research**, v. 30, n. 7, p. 1041-1048, 1989.

RITZE, Y.; BÁRDOS, G.; HUBERT, A.; BÖHLE, M.; BISCHOFF, S. C. Effect of tryptophan supplementation on diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 01, p. 1-7, 2014.

RIVERA, J. A.; HOHLBERG, A. I.; AGUILERA, J. M.; PLHAK, L. C.; STANLEY, D. W. Hard-to-cook defect in black beans—peroxidase characterization and effect of heat pretreatment and storage conditions on enzyme inactivation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 22, n. 3, p. 270-275, 1989.

RODRIGUEZ, S. H. S.; ALVARADO, E. D. R.; VÁSQUEZ, G. E. B., FÉLIX, C. S. C. El efecto estresante del tabaco, alcohol, sobrepeso y exceso de ejercicio físico, es

manifestado a través de la expresión de la hsp70. **Archivos de Medicina**, v.2, n. 4, 2006.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant starch—a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2006.

SÁNCHEZ, A.; CALPENA, A. C.; CLARES, B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: role of melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 16981-17004, 2015.

SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Dietary fibre and cardiovascular health. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 1, p. 31-45, 2012.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. Botânica. In: **Feijão**. 2.ed., Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 41-65.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SCHETT, G.; ELEWAUT, D.; MCINNES, I. B.; DAYER, J. M.; NEURATH, M. F. How cytokine networks fuel inflammation: toward a cytokine-based disease taxonomy. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 822-824, 2013.

SCHNEEMAN, B. O. Dietary fiber and gastrointestinal function. In (Ed.): **Nutrition Research: Advanced dietary fiber technology**, Oxford, United Kingdom: Blackwell Science, v. 18, 2001., p. 168-176.

SCHNEEMAN, B. O. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1424-1427, 1999.

SCHOENINGER, V.; COELHO, S. R. M.; PALOSCHI, C. L.; PRADO, N. V. Qualidade físico-química e tempo de cozimento de grãos de feijão novos e envelhecidos em condições de armazenamento refrigerado. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 3, n. 2, p. 55-65, 2013.

SEENA, S.; SRIDHAR, K. R.; BAJIA, B. Biochemical and biological evaluation of an unconventional legume, *Canavalia maritima* of coastal sand dunes of India. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2005.

SHEN, C. L.; CAO, J. J.; DAGDA, R. Y.; CHANJAPLAMMOOTIL, S.; LU, C.; CHYU, M. C.; GAO, W.; WANG, J. S.; YEH, J. K. Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet–induced obese rats. **Nutrition research**, v. 32, n. 6, p. 448-457, 2012.

SHIGA, T. M.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Effect of cooking on non-starch polysaccharides of hard-to-cook beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 100-109, 2009.

SHIGA, T. M.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. The effect of storage on the solubilization pattern of bean hull non-starch polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 362-367, 2011.

SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M.; FILISETTI, T. M. C. C. Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 53-64, 2004.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Effect of various domestic processing methods on antinutrients and in vitro protein and starch digestibility of two indigenous varieties of Indian tribal pulse, *Mucuna pruriens* var. *utilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3058-3067, 2001.

SIDDIQ, M.; RAVI, R.; HARTE, J. B.; DOLAN, K. D. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 232-237, 2010.

SIES, H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SILOCHI, R. M. H. Q.; COELHO, S. R. M., BISCHOFF, T. Z.; CASSOL, F. A. D. R.; DO PRADO, N. V.; E BASSINELLO, P. Z. Nutritional technological characterization and secondary metabolites in stored carioca bean cultivars. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 24, p. 2102-2111, 2016.

SILVA, F. C.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C.; MELO, P. G. S.; WENDLAND, A.; FERREIRA, B. H.; PAIVA, B. A. R. Selection of segregating populations with delayed darkening in carioca type common beans. **Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico**, 2011.

SINGH, A.; KUMAR, S.; BAJPAI, V.; REDDY, T. J.; RAMESHKUMAR, K. B.; KUMAR, B. Structural characterization of flavonoid C- and O-glycosides in an extract of *Adhatoda vasica* leaves by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 12, p. 1095-1106, 2015.

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock**, v. 24, n. 6, p. 583-589, 2005.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SIQUEIRA, B. S.; BASSINELLO, P. Z.; MALGARESI, G.; PEREIRA, W. J.; FERNANDES, K. F. Analyses of technological and biochemical parameters related to the HTC phenomenon in carioca bean genotypes by the use of PCA. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 939-945, 2016a.

SIQUEIRA, B. S.; BASSINELLO, P. Z.; SANTOS, S. C.; MALGARESI, G.; FERRI, P. H.; RODRIGUEZ, A. G.; FERNANDES, K. F. Do enzymatic or non-enzymatic pathways drive the postharvest darkening phenomenon in carioca bean tegument?. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 593-600, 2016b.

SIQUEIRA, B. S.; PEREIRA, W. J.; BATISTA, K. A.; OOMAH, B. D.; FERNANDES, K. F.; BASSINELLO, P. Z. Influence of Storage on Darkening and Hardening of Slow-and Regular-Darkening Carioca Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes. **Journal of Agricultural Studies**, v. 2, n. 2, p. 87-104, 2014.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M.; MAGNI, C.; MORANDI, S.; D'AGOSTINA, A.; ARNOLDI, A. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 18-23, 2004.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular pharmacology**, v. 71, p. 40-56, 2015.

SLUPSKI, J. Effect of cooking and sterilization on the composition of amino acids on immature seeds of flageolet beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1171–1176, 2010.

SOUR, S.; BELARBI, M.; SARI, N.; BENAMMAR, C. H.; BAGHDAD, C. H.; VISIOLI, F. Argan oil reduces, in rats, the high fat diet-induced metabolic effects of obesity. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 25, n. 4, p. 382-387, 2015.

SPADAFRANCA, A.; RINELLI, S.; RIVA, A.; MORAZZONI, P.; MAGNI, P.; BERTOLI, S.; BATTEZZATI, A. Phaseolus vulgaris extract affects glycometabolic and appetite control in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p. 1789-1795, 2013.

SPICKETT, C. M.; WISWEDEL, I.; SIEMS, W.; ZARKOVIC, K.; ZARKOVIC, N. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. **Free radical research**, v. 44, n. 10, p. 1172-1202, 2010.

SRAVANTHI, B.; JAYAS, D. S.; ALAGUSUNDARAM, K.; CHELLADURAI, V.; WHITE, N. D. G. Effect of storage conditions on red lentils. **Journal of Stored Products Research**, v. 53, p. 48-53, 2013.

STANLEY, D. W. A possible role for condensed tannins in bean hardening. **Food Research International**, Barking, v. 25, p. 187-192, 1992.

STANLEY, D. W.; AGUILERA, J. M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes-The influence of structure and composition. **Journal of Food Biochemistry**, v. 9, n. 4, p. 277-323, 1985.

STONE, N. J.; ROBINSON, J.; LICHTENSTEIN, A. H.; MERZ, C. N. B.; BLUM, C. B.; ECKEL, R. H.; GOLDBERG, A. C.; GORDON, D.; LEVY, D.; LLOYD-JONES, D. M.; MCBRIDE, P.; SCHWARTZ, J. S.; SHERO, S. T.; SMITH JR, S. C.; WATSON, K.; WILSON, P. W. F. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults. **Circulation**, v. 129, n. 25, p. S1-S45, 2013.

SU, C. C.; CHANG, C. S.; CHOU, C. H.; WU, Y. H. S.; YANG, K. T.; TSENG, J. K.; CHANG, Y.; CHEN, Y. L-carnitine ameliorates dyslipidemic and hepatic disorders induced by a high-fat diet via regulating lipid metabolism, self-antioxidant capacity, and inflammatory response. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 497-508, 2015.

SUFIAN, M. K. N. B.; HIRA, T.; ASANO, K.; HARA, H. Peptides derived from dolicholin, a phaseolin-like protein in country beans (*Dolichos lablab*), potently stimulate cholecystokinin secretion from enteroendocrine STC-1 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8980-8986, 2007.

SUFIAN, M. K. N. B.; HIRA, T.; NAKAMORI, T.; FURUTA, H.; ASANO, K.; HARA, H. Soybean β -conglycinin bromelain hydrolysate stimulates cholecystokinin secretion by enteroendocrine STC-1 cells to suppress the appetite of rats under meal-feeding conditions. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 848-853, 2011.

TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação - NEPA. Universidade Estadual de Campinas, 4ª ed., Campinas (SP), 2011.

TANG, C. H.; SUN, X.; YIN, S. W. Physicochemical, functional and structural properties of vicilin-rich protein isolate from three Phaseolus legumes: Effect of heat treatment. **Food Hydrocolloids.**, v. 23, p. 1771–1778, 2009.

TANG, D.; KANG, R.; XIAO, W.; JIANG, L.; LIU, M.; SHI, Y.; WANG, K.; WANG, H.; XIAO, X. Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide)-induced HMGB1 cytoplasmic translocation and release. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 7376-7384, 2007.

TAPSELL, L. C. Diet and metabolic syndrome: where does resistant starch fit in? **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 3, p. 756-760, 2004.

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; ZAJAC, N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 64, n. 2, p. 79-84, 2013.

TAWFIK, V. L.; WHITE, R. E.; GIFFARD, R. Glial Cells, Inflammation and Heat Shock Proteins in Cerebral Ischemia. In: **Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke**. InTech, p.177-192, 2012.

TEIXEIRA, J. V.; SIQUEIRA, B. D. S.; BASSINELLO, P. Z. Avaliação do escurecimento e endurecimento de genótipos de feijão carioca durante armazenamento. **CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO**, v.10, p 0-2, 2011.

TELLES, A. C.; KUPSKI, L.; FURLONG, E. B. Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. **Food Chemistry**, v. 214, p. 293-299, 2017.

THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates—structural complexity and functional diversity. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 65-84, 2002.

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes - A boon to human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 12, p. 507–518, 2003.

TOGNI, V. G. **Efeito da Salinidade Sobre a Resposta do Sistema Antioxidante e Expressão de HSP70 em Siris (gênero *Callinectes*)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. 75p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (Área de Concentração em Fisiologia) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological reviews**, v. 81, n. 3, p. 1031-1064, 2001.

VANIER, N. L.; RUPOLLO, G.; PARAGINSKI, R. T.; OLIVEIRA, M.; ELIAS, M. C. Effects of nitrogen-modified atmosphere storage on physical, chemical and technological properties of Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 20, n. 1, 2014.

VERONESI, M. B.; SIMÕES, K.; SANTOS-JUNIOR, N. A.; BRAGA, M. R. Carbohydrate mobilisation in germinating seed of *Enterolobium contortisiliquum* and *Peltophorum dubium* (Fabaceae), two tropical trees used for restoration. **Australian Journal of Botany**, v. 62, n. 2, p. 132-140, 2014.

VIEIRA, E. H. N.; YOKOYAMA, M. Colheita, processamento e armazenamento. In: **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, p. 233-248, 2000.

WALCHER, D.; MARX, N. Insulin resistance and cardiovascular disease: the role of PPAR γ activators beyond their anti-diabetic action. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 1, n. 2, p. 76-81, 2004.

WANG, W.; DE MEJÍA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.4, n.4, p.63-78. 2005.

WANG, X.; YUAN, B.; DONG, W.; YANG, B.; YANG, Y.; LIN, X.; GONG, G. Induction of heat-shock protein 70 expression by geranylgeranylacetone shows cytoprotective effects in cardiomyocytes of mice under humid heat stress. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93536, 2014.

WANG, Y. K.; ZHANG, X.; CHEN, G. L.; YU, J.; YANG, L. Q.; GAO, Y. Q. Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 359-372, 2016.

WESTERBACKA, J.; LAMMI, K.; HÄKKINEN, A. M.; RISSANEN, A.; SALMINEN, I.; ARO, A.; YKI-JÄRVINEN, H. Dietary fat content modifies liver fat in

overweight nondiabetic subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 2804-2809, 2005.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1001-1013, 1995.

WHITE, C. W. Expression of manganese superoxide dismutase is not altered in transgenic mice with elevated level of copper-zinc superoxide dismutase. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, p.629-636, 1993.

WHO. Doenças cardiovasculares. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em 27 de janeiro de 2017.

YIN, S. W.; TANG, C. H.; WEN, Q. B.; YANG, X. Q. Conformational and thermal properties of phaseolin, the major storage protein of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 94–99, 2011.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

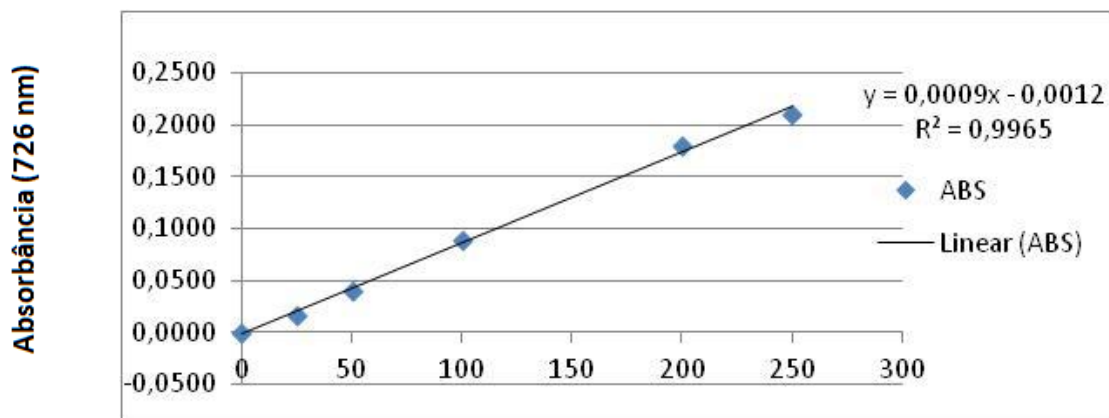
ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food research international**, v. 40, n. 6, p. 661-667, 2007a.

ZHONG, F.; ZHANG, X.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. **Food research international**, v. 40, n. 6, p. 756-762, 2007b.

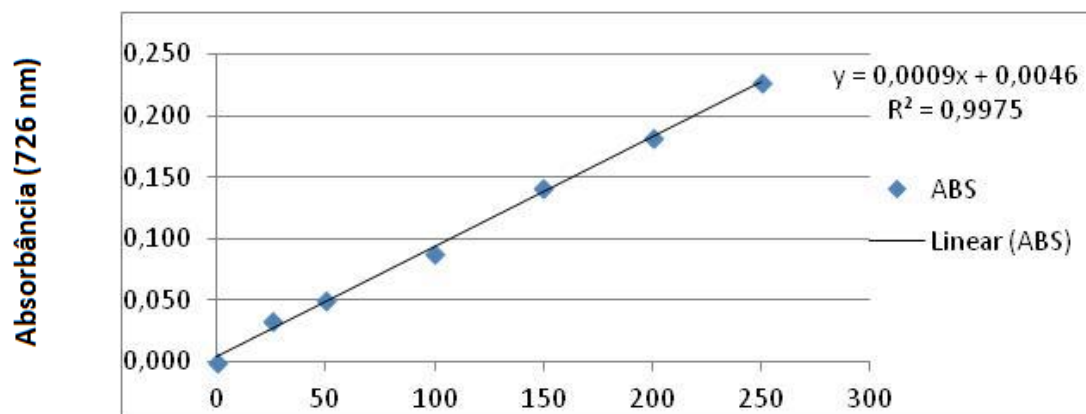
ZHOU, Y.; HOOVER, R.; LIU, Q. Relationship between α -amylase degradation and the structure and physicochemical properties of legume starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 3, p. 299-317, 2004.

10 APÊNDICES

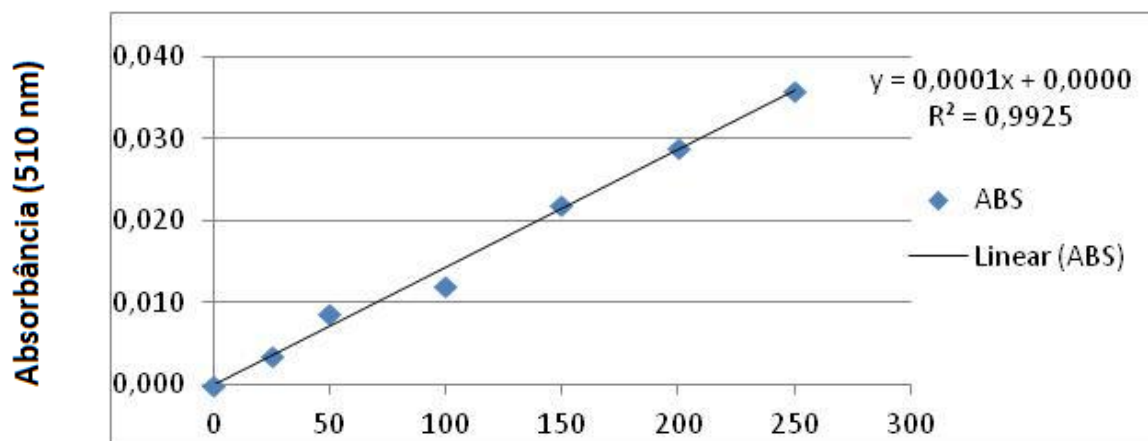
APÊNDICE 1 – Curva analítica para determinação de fenólicos totais da farinha crua e cozida de feijão



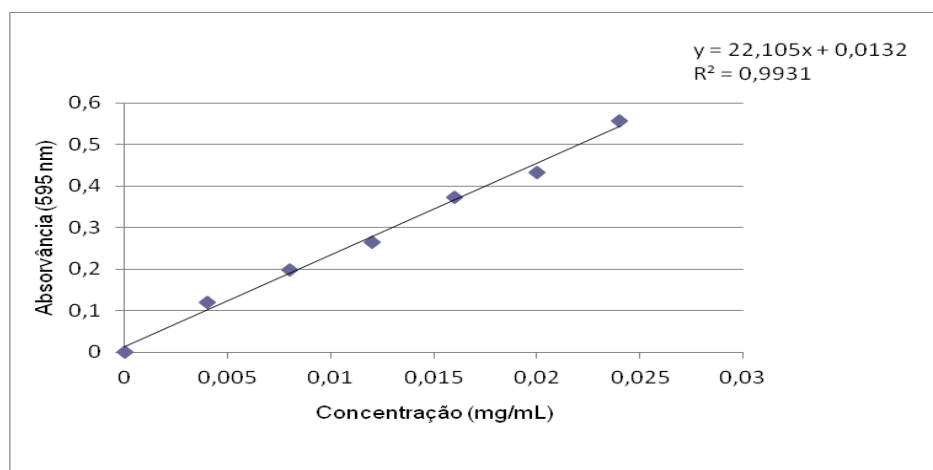
APÊNDICE 2 – Curva analítica para determinação de fenólicos totais do hidrolisado proteico de feijão



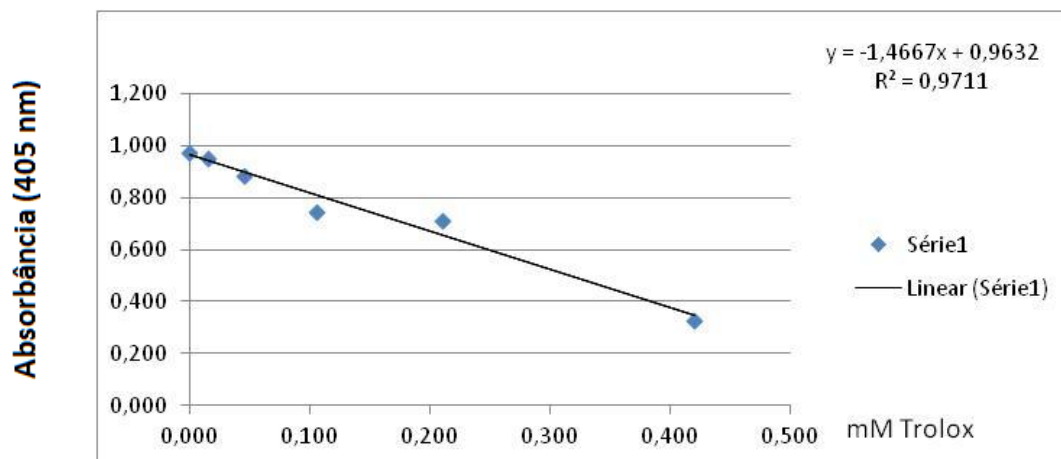
APÊNDICE 3 – Curva analítica para determinação de flavonoides totais da farinha crua de feijão



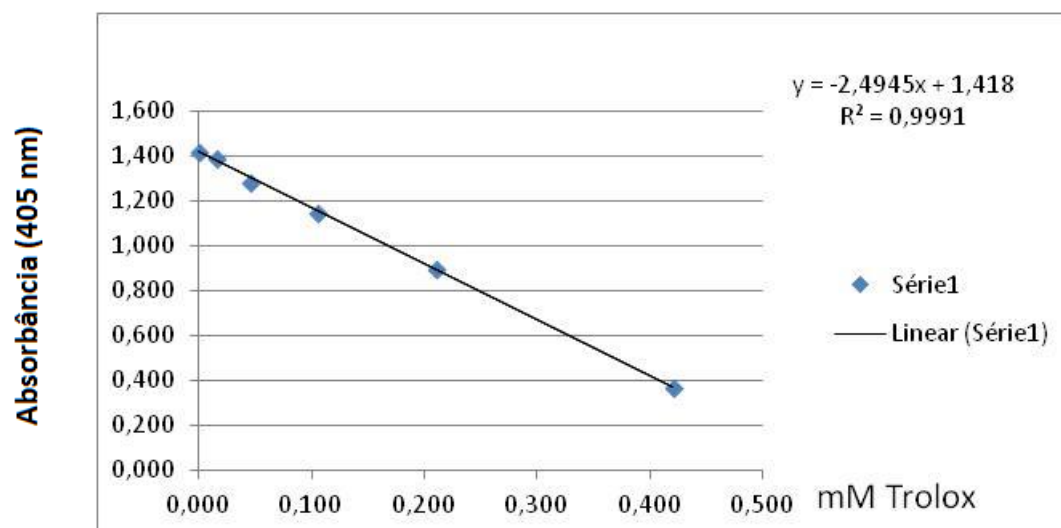
APÊNDICE 4 – Curva analítica para determinação das concentrações de proteína do homogenato do fígado



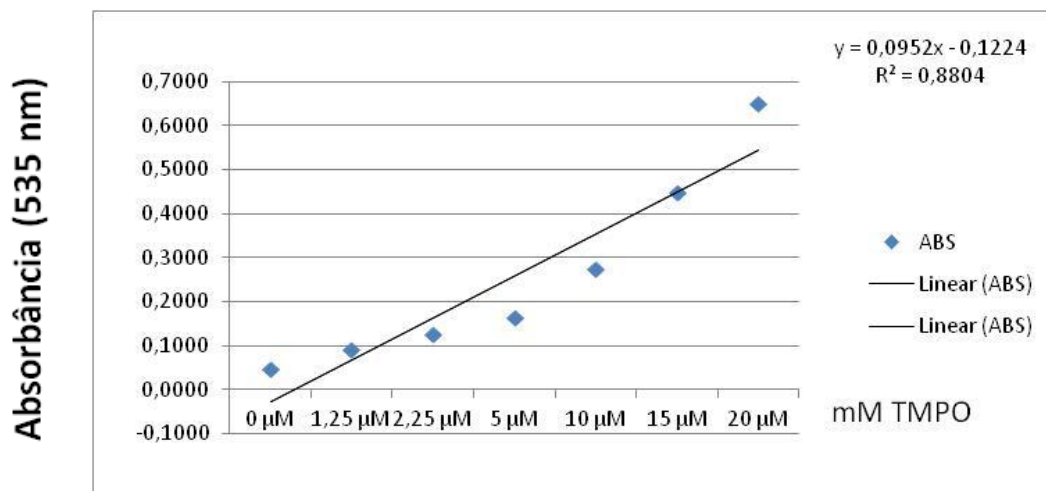
APÊNDICE 5 – Curva analítica para determinação da capacidade antioxidante total do homogenato do fígado



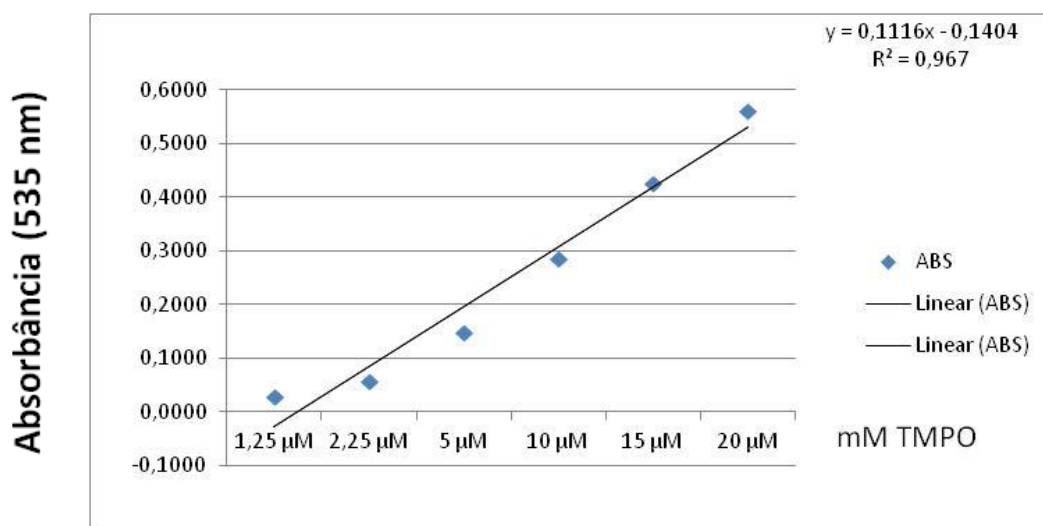
APÊNDICE 6 – Curva analítica para determinação da capacidade antioxidante total do soro



APÊNDICE 7 – Curva analítica para determinação de malondialdeído do homogenato do fígado



APÊNDICE 8 – Curva analítica para determinação de malondialdeído do soro



11 ANEXO

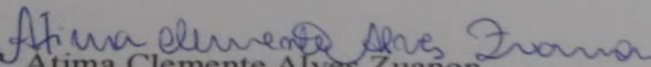
ANEXO – Parecer da Comissão de Ética para Uso de Animais

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 97/2015, intitulado “Feijão comum *Phaseolus vulgaris* L.: efeito do armazenamento sobre a composição nutricional e resposta hipolipemiante e hipocolesterolêmica da farinha integral, hidrolisado e peptídeo bioativo em ratos”, coordenado pela professora Hércia Stampini Duarte Martino do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 04/03/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 97/2015, named “Common bean *Phaseolus vulgaris* L.: effect of storage on the nutritional composition and lipid-lowering response and hypocholesterolemic the whole meal, hydrolyzed and bioactive peptide in rats”, is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 04, 2016 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV