

TELMA FALLIERI NASCIMENTO QUEIROZ

**RELAÇÃO ENTRE CONTEÚDO DE TANINOS E COR DO
TEGUMENTO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) DO TIPO CARIOCA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

TELMA FALLIERI NASCIMENTO QUEIROZ

**RELAÇÃO ENTRE CONTEÚDO DE TANINOS E COR DO
TEGUMENTO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) DO TIPO CARIOCA**

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

APROVADA: 02 de julho de 2004.

Prof. José Eustáquio Souza Carneiro
(Conselheiro)

Prof^a. Denise Cunha F. Santos Dias
(Conselheira)

Prof^a Maria Regina Araújo Gomes

Dr. Trazilbo José de Paula Jr.

Prof. Maurílio Alves Moreira
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força para superar as dificuldades.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao departamento de Fitotecnia, por me receber e proporcionar um ótimo curso e ao prof. Tocio Sedyama, coordenador da pós-graduação, pela atenção, amizade e bons conselhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Maurílio Alves Moreira, pela oportunidade, confiança, apoio e amizade.

Ao Prof. José Eustáquio Souza Carneiro, pela incomum boa vontade e disponibilidade demonstradas.

A Prof. Denise Cunha F. Dias, pelas sugestões apresentadas.

Ao Dr. Trazilbo José de Paula Júnior, que me encaminhou ao BIOAGRO, proporcionando assim, de forma indireta, que eu chegasse até o curso de doutorado.

A bondade da Prof. Maria Regina Araújo Gomes, que com simplicidade, simpatia e amizade me ensinou grande parte do que sei sobre taninos.

A Ana Lília Alzatte-Marin, minha grande incentivadora, amiga e conselheira.

Ao Newton, pela boa vontade, disponibilidade, bondade e imensa ajuda proporcionadas.

A Prof. Maria Goreti, juntamente com seus alunos, pela boa vontade sempre demonstrada em me permitir usar o Laboratório de Enzimologia.

A D. Lígia, Léo e Valério, do Laboratório de Pigmentos e Secagem do DTA, pelos ensinamentos e pela boa acolhida.

Aos funcionários do BIOAGRO: Fausto, Aloísio, Gláucia, Naldo, João Paulo, “Seu Pintinho”, Marcos, José Carlos e Jander, pelo grande apoio.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia Marcos (Lab. Sementes), Mara, Vicente, Luizinho e Caetano, sempre atenciosos e prestativos.

Às minhas filhas: Lídia, Cecília e Isabela, pelo amor, carinho, amizade e compreensão que sempre me dedicaram e ao Domingos meu companheiro.

À minha mãe Angelina, meu pai Antônio que se foi, mas onde está, compartilha a alegria desta vitória alcançada e meus irmãos Teldo e Tércio, pelo incentivo.

Aos meus Tios Joel e Luiz Alexandre, à Tia Baby, à Vó Marta e às Tias que não estão mais aqui, pelo apoio incondicional e incentivo.

A Raquel, grande amiga que conheci no Mestrado, pela ajuda, consolo nos momentos difíceis, carinho e cuidado com todos de minha casa.

Aos colegas do BIOAGRO: Wagner, Fábio, Chico, Lucinete, Márcia Flores, Márcia Regina, Cândida, Vilmar, Lucimara e Luciano pela ajuda e alegre convivência.

A Ritinha, companheira desde meus primeiros tempos de BIOAGRO, juntamente com a Inês.

Ao Maximiler, que com seu estágio me proporcionou uma grande ajuda e ao Leandro pelos gráficos.

Aos amigos sempre presentes, Vanderlei, Josete e Marlei.

Meu carinho e obrigada a todos que estiveram comigo neste período e espero continuarem presentes em minha vida.

BIOGRAFIA

TELMA FALLIERI NASCIMENTO QUEIROZ, filha de Antônio Nascimento e Angelina Maria Fallieri Nascimento, nasceu em Perdões, Estado de Minas Gerais, em 23 de junho de 1957.

Em julho de 1981, graduou-se em Agronomia pela Escola Superior de Agricultura de Lavras, atualmente Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Lecionou no Curso Técnico Agrícola da Escola da Comunidade Dulce Oliveira, em Perdões, MG.

Foi bolsista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA-CNPMS); posteriormente foi admitida na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) como pesquisadora, sendo a primeira responsável-técnico do Laboratório de Análise de Sementes de Janaúba, MG.

No Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO – UFV), atuou como bolsista, auxiliando na execução de projetos.

Em agosto de 1997, ingressou no Programa de Mestrado em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2000.

Em março de 2000, ingressou no Curso de Doutorado em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2004.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância e significado social da cultura do feijão	3
2.2. Qualidade tecnológica do feijão.....	3
2.3. Fatores antinutricionais: taninos	4
2.4. Função dos taninos.....	7
2.5. Eliminação dos taninos	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
CAPÍTULO I – ESTIMATIVA DE HERDABILIDADE DO CONTEÚDO DE TANINOS EM SEMENTES DE FEIJÃO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) DO TIPO CARIOCA.....	12
RESUMO	12
SUMMARY	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

4. CONCLUSÕES.....	26
5. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II – CONTEÚDO DE TANINOS EM SEMENTES DE FEIJÃO DO TIPO CARIOCA E SUA RELAÇÃO COM A COR DO TEGUMENTO, TEMPO DE ARMAZENAMENTO E PROCEDÊNCIA DA SEMENTE.....	29
RESUMO	29
SUMMARY	31
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
A) Determinação do conteúdo de taninos e cor em sementes submetidas a três períodos de armazenamento	35
Teste colorimétrico.....	35
Determinação do conteúdo de taninos	36
B) Determinação de taninos e cor em sementes provenientes de diferentes localidades.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
A) Conteúdo de taninos, períodos de armazenamento e cor do tegumento.	38
B) Conteúdo de taninos locais de produção e cor do tegumento das sementes	45
4. CONCLUSÕES.....	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
CAPÍTULO III –ALTERNATIVAS DE AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DO CONTEUDO DE TANINOS EM SEMENTES DE FEIJÃO	52
RESUMO	52
SUMMARY	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
Microanálise (utilização de parte do tegumento).....	58
Análise de todo tegumento.....	59

Análise de toda a semente	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4. CONCLUSÕES.....	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE	67

RESUMO

QUEIROZ, Telma Fallieri Nascimento, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Julho 2004. **Relação entre conteúdo de taninos e cor do tegumento em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do tipo carioca.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: José Eustáquio Souza Carneiro e Denise Cunha Fernandes Santos Dias.

A dieta comum com vegetais que contem compostos fenólicos, não é considerada tóxica em quantidades e condições normais. Taninos condensados são uma exceção. Os efeitos danosos de taninos em dietas dizem respeito à sua interação com proteínas, afetando assim a qualidade nutricional do alimento. Os taninos também podem estar envolvidos em reações que levam ao escurecimento do tegumento de sementes de feijão após a colheita. O feijão-comum tem um conteúdo de taninos no tegumento da semente que varia de 0 a 20%, dependendo do tipo e da cor. Os taninos são encontrados em maior quantidade no tegumento das sementes e muito pouco nos cotilédones. Os objetivos deste trabalho foram iniciar um estudo genético da presença de taninos em feijão, o conhecimento de linhagens existentes com relação a esta característica e avaliar diferentes procedimentos de obtenção de amostra para determinação do conteúdo de taninos nas sementes. Para o estudo genético foi realizado o cruzamento de uma linhagem de feijão do tipo carioca, AB-74-1-18, do Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV e a linhagem de feijão branco NEP-2,

com ausência ou não detectável presença de taninos, obtendo-se a geração F_1 . As gerações F_2 e F_3 foram obtidas por autofecundação. Sementes F_3 colhidas de uma mesma planta originaram famílias $F_{3,4}$, nas quais foi feita a determinação do conteúdo de taninos. Foram obtidas as estimativas de variância e determinada a herdabilidade no sentido amplo. A alta estimativa de herdabilidade no sentido amplo que foi encontrada (90,15%) indicou que na seleção de genótipos para conteúdo de taninos realizada na geração F_4 a maior parte da variação observada para esta característica é de origem genética. O estudo de linhagens constou da determinação do conteúdo de taninos e da cor do tegumento da semente em 20 linhagens de feijão do tipo carioca, em três períodos de armazenamento: período 1 (logo após a colheita), período 2 (6 meses) e período 3 (12 meses) após a colheita. Essas mesmas linhagens foram plantadas em três locais diferentes, para estudo de possíveis modificações no conteúdo de taninos e na cor da semente, em função da mudança de ambiente. A determinação do conteúdo de taninos foi feita utilizando-se do Método da Vanilina/HCl, e a cor foi avaliada em colorímetro (Colorquest II do sistema Hunter), com leitura de reflectância. Os dados relativos aos três períodos foram submetidos à análise de variância e de regressão. Para os dados dos três locais de plantio foi feita análise de variância e teste de médias. Em todas as linhagens foram detectadas alterações no conteúdo de taninos e na cor do tegumento com o armazenamento. O escurecimento do tegumento foi mais intenso nas linhagens Vi 0669, OP-S-82, OP-S-193, NA-LAV-51, Talismã e Pérola. O conteúdo de taninos apresentou valores menores com o armazenamento, possivelmente pela formação de polímeros de difícil extração. Menores conteúdos foram encontrados nas linhagens VC2, VC3 e VC5, em todos os períodos, com seus tegumentos mantendo-se mais claros do que as demais. Concluiu-se que o conteúdo de taninos e a cor do tegumento são características que são relacionadas e sofrem influência do ambiente de plantio. As linhagens de feijão carioca com baixos conteúdos de taninos são mais claras e sofrem poucas alterações na cor com o armazenamento. Para os procedimentos de obtenção da amostra foram utilizadas sementes de feijão de três linhagens com cores do tegumento e conteúdos de taninos diferentes: linhagem vermelha,

com maior conteúdo, linhagem tipo carioca com conteúdo médio e linhagem branca com ausência ou baixo conteúdo. Os procedimentos de obtenção das amostras foram três: parte do tegumento retirado e triturado (microanálise), todo o tegumento retirado, liofilizado e triturado e toda a semente triturada (procedimento normalmente mais utilizado). Utilizou-se o método da Vanilina-HCl, com três repetições. Pela análise de variância, constatou-se que a análise de todo o tegumento da amostra liofilizado e triturado é eficiente para determinação do conteúdo de taninos e para classificação das linhagens, apresentando valores mais precisos. A utilização da semente inteira triturada separa linhagens distintas quanto ao conteúdo de taninos, porém seus valores são subestimados, sendo necessário corrigi-los. A microanálise pode ser utilizada como um procedimento não destrutivo de constatação da presença ou ausência de taninos, sem considerar seus valores quantitativos.

ABSTRACT

QUEIROZ, Telma Fallieri Nascimento, D.S. Universidade Federal de Viçosa, July 2004. **Relationship between tannin contents and the tegument color in the carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee members: José Eustáquio Souza Carneiro and Denise Cunha Fernandes Santos Dias.

The common diet with vegetables containing phenolic compounds is not considered as a toxic one under normal amounts and conditions. The condensed tannins are an exception. The harmful effects of the tannins in diets are related to their interaction with proteins, so affecting the nutritional quality of the food. In addition, tannins may also be involved into reactions that lead to the darkening of the tegument in bean seeds before or after harvesting. The common bean has a content of tannins in the seed tegument that varies from 0 to 20%, depending on the bean type and tegument color. The tannins are found at a higher amount in the seed tegument, but very few in cotyledons. The objectives of this work were to begin a genetic study of the tannin presence in bean, to know the existent lines in relation to this trait, and evaluate different procedures to obtaining the sample for the determination of tannin contents in the seeds. For the genetic study, the line AB-74-1-18 of the carioca bean from the Bean Plant Genetic Improvement of the BIOAGRO/UFV was crossed with the line of the white bean NEP-2, in which the tannins were absent or nondetectable, so obtaining the F₁ generation.

The generations F_2 and F_3 were obtained by self-fecundation. The F_3 seeds harvested from a same plant gave rise to the families $F_{3:4}$, in which the determination of the tannin contents were performed. The variance estimates were obtained and the heritability was determined in its wide sense. The high value of the heritability in its wide sense (90.15%) pointed out that in genotype selections for tannin contents, that was accomplished in the F_4 generation, most of the variation observed for this characteristic is genetically originated. The study of the lines consisted of determining the tannin contents and the seed tegument color in 20 lines of the carioca bean, during three storage periods: period 1 (just after harvesting), period 2 (6 months) and period 3 (12 months) after the harvest. Those same lines were sown in three different places in order to study the possible modifications in either tannin contents and the seed color as a function of the environmental change. The determinations of the tannin contents were accomplished, by applying the Vanillin/HCl Method, while and the color was evaluated in a colorimeter (Colorquest II of the Hunter System) with reflectance reading. The data relative to those three periods were subjected to both variance and regression analyses. The data of the three planting places were submitted to the variance analysis and mean test. In all lines, some alterations were found in the tannin contents and the tegument color after storage. The darkening of the tegument was more intense in the lines Vi 0669, OP-S-82, OP-S-193, NA-LAV-51, Talismã and Pérola. The tannin contents decreased as the storage time were increased, probably due to the formation of the hardly extracted polymers. In the lines VC2, VC3 and VC5 lower values were found during all periods, and their teguments were kept clearer than those of the other ones. It was concluded that the tannin contents and the tegument color are related characteristics and are affected by the sowing environment. The carioca bean lines with low tannin contents are clearer ones, and their colors are just slightly changed when they are stored. For the procedures in obtaining the sample, some bean seeds of three lines with different tegument colors and tannin contents were used: red line with higher tannin content; carioca line with average tannin content; and white line with absence or lower tannin content. Three procedures

were used for obtaining the samples: a tegument part was removed and triturated (microanalysis); the whole tegument was removed, lyophilized and triturated, and the whole seed was triturated (the usually more used procedure). The Vanillin-HCl method was applied, with three replicates. The variance analysis shows that the use of the whole lyophilized and triturated tegument of the samples is efficient for determination of the tannin content as well as the classification of the lines, as presenting more accurate values. Using the whole triturated seed will make possible a distinct separation of the different lines for the tannin contents; however, their values are underestimated and need some corrections. The microanalysis might be used as a nondestructive procedure for verification of the presence or absence of tannins, without considering their quantitative values.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa muito consumida em diversas regiões do mundo, principalmente no Brasil, onde constitui uma importante fonte de proteínas e outros nutrientes, principalmente, para a população com menor poder aquisitivo. Devido a importância desta leguminosa na alimentação humana, os estudos mundiais sempre buscaram uma maior produção e produtividade, combate a pragas e doenças e melhor qualidade nutricional, o que possibilitaria um aumento na disponibilidade de alimentos para o consumo das populações.

Atualmente, as pesquisas com o feijão têm sido desenvolvidas no sentido da melhoria da qualidade tecnológica dos grãos, com ênfase em aspectos comerciais, culinários e nutritivos. Estes aspectos abrangem, por exemplo, características como tipo de grão, cor, sabor e conteúdo protéico.

Dentre os tipos de feijões consumidos no Brasil, destacam-se os feijões com tegumento bege e rajas marrons, comumente denominados “carioca”. A preferência é pelo cultivar que apresenta tegumento claro, chamado de carioca “leite”, e que permaneça claro após o armazenamento.

O escurecimento do tegumento, após a colheita, tem sido atribuído à presença de compostos fenólicos, como os taninos. Nos últimos anos, as pesquisas se intensificaram a respeito do papel que esses compostos podem ter em leguminosas e, especialmente, no feijão. Os compostos fenólicos, através de reações enzimáticas ou químicas, podem formar polímeros de alto peso molecular e altamente coloridos, levando a alterações na cor do tegumento das sementes. Taninos ocorrem, naturalmente, em sementes de cereais e leguminosas e, quando presentes em grandes quantidades, podem diminuir a biodisponibilidade de proteínas e minerais. Esta diminuição ocorre devido à formação de complexos entre os polifenóis e proteínas, os quais são insolúveis e de baixa digestibilidade, tornando a proteína parcialmente indisponível, ou, pela inibição de enzimas digestivas e pelo aumento do nitrogênio fecal.

Portanto, tornam-se necessários estudos genéticos do conteúdo de taninos em sementes de feijão, de modo a orientar futuros trabalhos de melhoramento no que se refere à obtenção de cultivares com grãos de maior valor comercial, ou seja, com baixa concentração de taninos.

Como não há uma padronização da metodologia para determinação de taninos e vários fatores afetam as metodologias usuais, são também necessários estudos para o aperfeiçoamento desta análise.

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivos: iniciar um estudo genético da presença de taninos em feijão; avaliar o comportamento de linhagens de feijão do tipo carioca, quanto ao conteúdo de taninos, escurecimento do tegumento e possíveis associações entre essas duas características; e avaliar diferentes procedimentos de obtenção de amostra para determinação do conteúdo de taninos em sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância e significado social da cultura do feijão

O feijão é uma das mais antigas culturas do Novo Mundo. É encontrado em baixas e médias altitudes nas Américas, cultivado em sistema de monocultivo, associado ou em rotação com outras culturas. Seus grãos podem ser consumidos maduros, imaturos, bem como a parte vegetativa verde (tanto folhas quanto vagens) (Broughton et al., 2003).

A produção mundial total de feijões excede 23 milhões de toneladas, sendo que sete milhões são produzidos na América Latina e África. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão, com uma área de plantio superior a cinco milhões de hectares e consumo anual per capita de 17,2 kg, estimado em 2003. (Broughton et al., 2003).

O feijão é, possivelmente, o produto de mais alto significado social na composição da agricultura brasileira. Está, constantemente, associado ao pequeno produtor como um cultivo de subsistência e alimento de referência da população urbana e rural. No Brasil, somente 4% da área e 15% da produção de feijão são derivados de sistemas irrigados com alta tecnologia (Broughton et al., 2003).

As leguminosas são uma fonte básica alimentar, especialmente em países em desenvolvimento, em termos energéticos e nutricionais. O feijão comum é uma boa fonte de proteínas (20-25%) e vitaminas, uma excelente fonte de carboidratos e ácidos graxos livres (linoléico e linolênico), além de fornecer grande quantidade de fibras solúveis e insolúveis (Schneeman, 1986).

2.2. Qualidade tecnológica do feijão

A qualidade dos grãos de feijão pode ser considerada de três maneiras, sob o aspecto tecnológico: comercial, culinária e nutritiva.

Por qualidade comercial entende-se o tipo de grão, ou seja, cor, brilho, forma e tamanho dos grãos. Estas características são, geralmente, alvo de programas de melhoramento.

Dentre as características culinárias desejáveis pelos consumidores estão a rápida hidratação, baixo tempo de cocção, produção de caldo espesso, bom sabor e textura, assim como a casca delgada com boa estabilidade de cor. A integridade dos grãos, após cozimento tem importante aplicação industrial. A qualidade culinária das sementes é tão decisiva para o futuro de um novo cultivar quanto o seu tipo comercial (Vieira et al., 1999).

O feijão apresenta componentes, que tornam seu consumo vantajoso do ponto de vista nutricional. O feijão apresenta conteúdo protéico relativamente alto, um teor elevado de lisina, que exerce efeito complementar às proteínas dos cereais, além de fibras alimentares com efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, alto conteúdo de carboidratos complexos e presença de vitaminas do complexo B. Por outro lado, alguns problemas nutricionais como a baixa digestibilidade protéica, reduzido conteúdo de aminoácidos sulfurados, presença de fatores antinutricionais e baixa disponibilidade de minerais têm merecido a atenção de vários grupos de pesquisa.

2.3. Fatores antinutricionais - taninos

Em estado natural, o feijão contém algumas substâncias tóxicas e antinutricionais, como compostos fenólicos (polifenóis), fitatos, inibidores de proteases, fitohemaglutininas, fatores alergênicos e de flatulência.

Os compostos fenólicos são os ácidos fenólicos e derivados, lignina, taninos e flavonóides (Taiz & Zeiger, 1991). Estes compostos estão entre os mais numerosos e amplamente distribuídos nos grupos do reino vegetal.

Compostos fenólicos de plantas constituem um grupo heterogêneo, sob o ponto de vista metabólico e são biossintetizados por rotas diferentes. Duas rotas básicas estão envolvidas: a rota do ácido shiquímico e a do ácido malônico. A rota do ácido shiquímico tem relação com a biossíntese da maioria dos

compostos fenólicos de plantas. A rota do ácido malônico, entretanto, é uma importante fonte de compostos fenólicos secundários em fungos e bactérias e de menor importância em plantas superiores (Taiz & Zeiger, 1991).

Os taninos compreendem um grupo heterogêneo de polifenóis capazes de combinar com proteínas. Seu peso molecular está entre 500 a 3000 daltons e eles contêm grupos hidroxifenólicos suficientes para permitir a ligação com proteínas. São armazenados em vacúolos, ou no citoplasma, ou podem ser depositados nas células-guarda. Células contendo taninos ocorrem, especialmente, na camada externa do tegumento das sementes, mas, muitas vezes também em camadas internas deste, como em várias monocotiledôneas (Boesenwinkel & Bouman, 1995).

Os taninos são, normalmente, divididos em hidrolisáveis e condensados (Mangan, 1988). Os hidrolisáveis são polímeros heterogêneos contendo ácidos fenólicos, especialmente ácido gálico, complexados com açúcares simples. Como são formados por cadeias menores, são facilmente hidrolisados química ou enzimaticamente e podem ser quebrados em açúcares e ácidos carboxílicos fenólicos (C₆-C₃-C₆)_n. Os condensados, em sua maioria, são polímeros de flavan-3-ol (catequina) ou flavan 3,4 diol (leucoantocianidinas). São, geralmente, constituintes do tecido lenhoso de plantas. Taninos condensados podem ser hidrolisados para antocianidinas, através de tratamento com ácidos fortes e, deste modo, são chamados protocianidinas por alguns autores. Eles causam diminuição na digestibilidade de proteínas e carboidratos pela formação de complexos (Taiz & Zeiger, 1991).

Os taninos condensados parecem desempenhar importante função em reações, que levam ao endurecimento do tegumento e à conseqüente não-absorção de água suficiente durante a embebição, ocasionando, assim, o fenômeno “hard-to-cook” (dureza no cozimento). Oxidação de taninos no revestimento do grão também pode restringir a mobilidade da água e, assim, contribuir para condições de dureza em sementes de leguminosas armazenadas (Stanley, 1992).

O conteúdo de taninos no tegumento de feijão varia de 0 a 20%, dependendo da espécie e da cor (Kigel, 1999).

Há uma diminuição significativa de taninos, principalmente no tegumento como resultado do armazenamento. Possivelmente, isto é devido a reações com alguns componentes do feijão, tais como proteínas e carboidratos. Por outro lado, é possível a ocorrência de polimerização, que pode estar relacionada à dureza e escurecimento do feijão (De León et al., 1989).

Os polifenóis, dentre os fatores antinutricionais, são os que mais contribuem para a baixa digestibilidade do feijão em animais e humanos. Isto pode ser explicado pela formação de complexos entre os polifenóis e as proteínas, os quais são insolúveis e de baixa digestibilidade, tornando a proteína parcialmente indisponível ou, pela inibição de enzimas digestivas e pelo aumento do nitrogênio fecal (Bressani & Elias, 1980).

Foi constatado, por Hernandez et al. (1991), que as características e o efeito de ligações entre proteínas e polifenóis dependem do tipo de interação, covalente ou não-covalente. Ligações não-covalentes podem ocorrer em meio ácido ou neutro e são reversíveis. Os polifenóis, que podem estabelecer essas ligações com proteínas, são principalmente os poliméricos ou taninos, embora os monoméricos ou não taninos também possam ligar-se de modo não covalente às proteínas. Como consequência, o valor nutricional é diminuído e a estrutura tridimensional das proteínas é modificada, alterando suas propriedades funcionais. As interações covalentes entre polifenóis e proteínas, juntamente com uma série de transformações enzimáticas, contribuem para o fenômeno de escurecimento. Estas interações são irreversíveis e, no caso de aminoácidos essenciais estarem envolvidos nas ligações com polifenóis, haverá um decréscimo do valor nutricional do alimento, além de alterações na qualidade organoléptica.

Dentre os feijões consumidos no Brasil, destacam-se os de tegumento bege e rajas marrons, comumente denominados “carioca”. A preferência é pelo cultivar que apresenta tegumento claro, chamado carioca “leite” e que permaneça

claro após o armazenamento. O escurecimento do grão antes e, ou após a colheita é um fator irreversível e influi na aceitação comercial.

O escurecimento de feijões durante o armazenamento constitui um problema econômico, pois, consumidores e processadores relutam em comprar grãos escuros, sendo a cor um parâmetro de qualidade. Em estudos realizados por Stanley (1992), estabeleceu-se que a mudança de cor resulta de uma transformação, induzida pelo calor, de leucoantocianinas incolores para antocianinas altamente coloridas e produtos marrons resultantes de polimerização.

Por outro lado, Reyes-Moreno e Paredes-López (1993) demonstraram, em avaliações utilizando colorímetro, que as alterações na cor do tegumento correspondem, geralmente, a um escurecimento não enzimático de feijões e atribuíram-nas à polimerização acelerada de compostos fenólicos de baixo peso molecular (taninos solúveis) a taninos condensados de alto peso molecular e fortemente coloridos.

Os compostos fenólicos também têm sido identificados como inibidores de absorção de ferro, possivelmente, devido à formação de complexos insolúveis com íon ferro no lúmen gastrointestinal (Brune, 1991).

Os efeitos biológicos de taninos em humanos e animais variam, consideravelmente, sendo agrupados nas seguintes categorias: formação de complexo tanino-proteínas ou outros componentes dos alimentos; inibição de enzimas digestivas; aumento da excreção de proteína endógena; efeitos no trato digestivo; e toxicidade dos taninos absorvidos e seus metabólitos (Deshpande et al., 1982).

2.4. Função dos taninos

Os taninos são um fator antinutricional com ação tóxica não-direta, causando baixa digestibilidade edificultando a metabolização.

Taninos são importantes substâncias de defesa química contra predadores de sementes, desde grandes vertebrados e insetos até fungos e micróbios. Isso

depende das propriedades combinadas de adstringência, que rendem ao tecido da planta impalatabilidade e precipitação protéica, que desnatura proteínas salivares de predadores e inativa enzimas extracelulares de microrganismos (Stanley, 1992). Outras prováveis funções de taninos são: proteger contra luz, conferir cor às sementes, restringir a germinação, dificultando a circulação de gases, bem como atrasar a decomposição do tegumento das sementes no solo (Taiz & Zeiger, 1991).

2.5. Eliminação dos taninos

Alguns métodos de processamento e tratamento têm sido usados para eliminar taninos em leguminosas. Estes incluem: remoção física de taninos por moagem e separação de cascas, imersão em água, cozimento, germinação e adição de complexantes de taninos à dieta. Entretanto, o mecanismo de descascamento dos grãos pode acarretar perdas substanciais de proteínas e outros nutrientes (Reddy et al., 1985).

A imersão em água pode contribuir para remoção de taninos indesejáveis, particularmente em variedades coloridas (redução de 3 a 4% de polifenóis) (Bressani & Elias, 1980). É possível que alguns taninos se difundam para o endosperma do cotilédone e se liguem às proteínas durante o molho. Soluções de bicarbonato de sódio, ou mistura de sais são mais eficientes que água na retirada de taninos (Reyes-Moreno & Paredes-López, 1993).

Geralmente o feijão necessita ser bem cozido para ser palatável. O cozimento, através do calor, inativa compostos antinutricionais, assim como permite a digestão e assimilação de amidos e proteínas (Kigel, 1999). O cozimento não é capaz de destruir taninos, mas estes são parcialmente removidos no caldo de cozimento. Menos de 10% dos taninos totais são decompostos durante o cozimento, enquanto cerca de 50% são carregados para o líquido de cocção (Ziena et al., 1991).

A germinação reduz ou elimina alguns fatores antinutricionais de feijões. A perda de taninos, durante a germinação, pode ser atribuída à presença de

polifenoloxidasas e hidrólises enzimáticas. Alguma perda de taninos, durante a germinação, também pode ocorrer devido à lixiviação na água (Rao & Deosthale, 1982).

Embora grande quantidade de polifenóis possa ser eliminada na água de lavagem e naquela utilizada no cozimento, o resíduo é retido principalmente pelos cotilédones. Isto se deve à migração aparente dos taninos do tegumento aos cotilédones. As quantidades de taninos ingeridas irão, então, depender da forma como os feijões são processados e consumidos (Bressani & Elias, 1980).

Devido à grande variação presente no conjunto gênico do feijoeiro é possível, através do melhoramento, diminuir a proporção de compostos antinutricionais (Broughton et al., 2003). Podem ser obtidas linhagens com baixos teores de taninos, selecionando-se linhas puras existentes ou cruzando e selecionando para recombinantes apropriados (Ma & Bliss, 1978). É necessário, entretanto, evitar o enfraquecimento da planta pelo decréscimo da função protetora dos taninos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F. The seed: structure and function. **Seed development and germination**, Kigel, J., Galili, G., Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, EUA, p.1-24, 1995.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L. G. The nutritional role of polyphenols in beans. **Polyphenols in Cereal and Legumes**, Hulse, J. H., Ed., Ottawa, Canadá, p.61-72, 1980.
- BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v.252, p.55-128, 2003.
- BRUNE, M. Determination of iron binding phenolic groups in foods. **Journal Food Science**, v.56, n.1, p 128-131, 1991.
- DE LEÓN, L.; BRESSANI, R.; ELÍAS, L. G. Effect of seed coat on the hard-to-cook phenomenon of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Latinoam. Nutr.**,v.39, n.3, p.405-418 , 1989.
- DESHPANDE, S. S.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K.; and CORNFORTH, D. P. Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Food Science**, v.47, n.6, p.1846-1850, 1982.
- HERNANDEZ, T.; HERNANDEZ, A.; MARTINEZ, C. Polyphenols in alfalfa leaf concentrates. **J. Agric. Food Chem.**, v.3, p.1120-1122, 1991.
- KIGEL, J. Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. **Biotech. Agron. Soc. Environ.** v.3, n.4, p.205-209, 1999.
- MA, Y.; BLISS, F. A. Tannin content and inheritance in common beans. **Crop Science**, v.18, n.2, p.201-204, 1978.
- MANGAN, J. L. Nutritional effects of tannins in animal feed. **Nutrition Research Reviews**, I: 209-231, 1988.
- RAO, P. U.; DEOSTHALE, Y. G. Tannin content of pulses: varietal differences and effects of germination and cooking. **Journal Science Food Agriculture**, v.33, p. 1013. 1982.

- REDDY, N. R.; PIERSON, M. D.; SATHE, S. K. and SALUNKHE, D. K. Dry bean tannins: a review of nutritional implication. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, n.62, p.541-549, 1985.
- REYES-MORENO, C.; PAREDES-LÓPEZ, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.3, p.227-286, 1993.
- SCHNEEMAN, B. O. Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis and physiological effects. **Food Technology**, v.40, n.2, p.104-110, 1986.
- STANLEY, D.W.A A possible role for condensed tannins in bean hardening. **Food Research International**, v.25, n.3, p.187-192, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City, Califórnia: The Benjamin/Cummings Company, Inc., 1991. 559p.
- VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Melhoramento do feijão. In: **Melhoramento de Espécies Cultivadas** / [Editado por] Aluízio Borém. – Viçosa: UFV, 1999. 817p.
- ZIENA, H. M.; YOUSSEF, M. M.; EL-MAHDY, A. R. Amino acid compositions and some antinutritional factors of cooked faba beans (Medamnins): effects of cooking temperature and time. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1347-1349, 1991.

CAPÍTULO I

ESTIMATIVA DE HERDABILIDADE DO CONTEÚDO DE TANINOS EM SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) DO TIPO CARIOCA

RESUMO

Escurecimento de feijões durante o armazenamento é um fator irreversível e constitui um problema econômico, pois consumidores e processadores relutam em comprar grãos escuros, sendo a cor um parâmetro de qualidade. É possível que a alteração na cor dos grãos seja em virtude da polimerização acelerada de compostos fenólicos de baixo peso molecular (taninos solúveis) a taninos condensados de alto peso molecular e altamente coloridos. Os taninos são encontrados no tegumento das sementes e muito pouco nos cotilédones, em pouca quantidade ou não detectáveis em feijões brancos, seguido dos pretos e dos vermelhos em maior quantidade. Este trabalho teve como objetivo iniciar um estudo genético da presença de taninos em feijão, para uma possível obtenção de linhagens tipo carioca com baixo conteúdo deste elemento. Foi realizado o cruzamento de uma linhagem de feijão carioca, AB-74-1-18, do Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV e a linhagem de feijão branco NEP-2, com ausência ou não detectável presença de taninos, obtendo-se a geração F_1 . As gerações F_2 e F_3 foram obtidas por autofecundação. Um total de 134 famílias foram tomadas na geração F_3 originando famílias $F_{3:4}$, nas quais se avaliou o conteúdo de taninos. Com base na geração $F_{3:4}$ foram obtidas estimativas de variância e herdabilidade no sentido amplo determinada a herdabilidade ampla, com base nas estimativas de variâncias. A alta estimativa de herdabilidade no sentido amplo que foi encontrada (90,15%) na geração F_4 indicou que a seleção de genótipos para conteúdo de taninos pode ser realizada em gerações precoces, sendo a maior parte da variação observada para esta característica de origem genética.

CHAPTER I

ESTIMATING THE HERITABILITY OF THE TANNIN CONTENTS IN SEEDS OF THE CARIOCA BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

SUMMARY

The darkening of beans during the storage is an irreversible factor and constitutes an economical problem, since the consumers and processors resist to buying dark beans; therefore, the color is an important quality parameter. It is possible that the change in the bean color would occur because the accelerated polymerization of the phenolic compounds with low molecular weight (soluble tannins) into condensed and highly colored tannins with high molecular weight. The tannins are found in the tegument of the seeds, just a few in cotyledons, whereas a few or non-detected amounts in the white beans, following the black ones and red ones at higher amounts. This work aimed at beginning a genetic study of the tannin presence in bean, in order to make possible the obtainment of carioca lines presenting a low content of this element. The carioca bean line AB-74-1-18 from the Bean Plant Genetic Improvement Program developed by the BIOAGRO/UFV was crossed with the white bean line NEP-2, with absence or non-detectable presence of tannins, so obtaining the F₁ generation. The generations F₂ and F₃ were obtained by self-fecundation. A total of 134 families were taken from generation F₃, then they gave rise to families F_{3:4}, in which the tannin contents were evaluated. Based on generation F_{3:4}, estimates of the variance and heritability in the wide sense were obtained, and the wide heritability was determined on the basis of the variance estimates. The high estimate of the heritability in the wide sense found (90,15%) in the F₄ generation pointed out that the selection of genotypes for tannin contents might be accomplished in precocious generations, since the most variation was observed for this genetically originated characteristic.

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas, em geral, contribuem com uma parcela significativa do aporte protéico das áreas tropicais e subtropicais. Cultivares de feijões, principalmente do gênero *Phaseolus*, são largamente aceitos e consumidos quase diariamente, pela população de menor poder aquisitivo, contribuindo com 18 a 35% do aporte de proteína da dieta, além do atendimento às necessidades de minerais e vitaminas (Sawazaki et al., 1985).

Entretanto, o feijão contém algumas substâncias tóxicas e antinutricionais, que são polifenóis, fitatos, inibidores de proteases, fitohemaglutininas, fatores cianogênicos e de flatulência.

Compostos fenólicos são os ácidos fenólicos e derivados, taninos e flavonóides. Encontram-se entre os mais numerosos e amplamente distribuídos nos grupos do reino vegetal. Taninos compreendem um grupo heterogêneo de polifenóis, com peso molecular entre 500 a 3000 daltons, capaz de combinar com proteínas.

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

Dentre os feijões consumidos no Brasil, destacam-se os feijões de tegumento bege com rajas marrons, comumente denominados “carioca”. A

preferência é pelo cultivar que apresenta tegumento claro, chamado carioca “leite” e que permaneça claro após o armazenamento. Escurecimento de feijões durante o armazenamento é um fator irreversível e constitui um problema econômico, pois, consumidores e processadores relutam em comprar grãos escuros, sendo a cor um indício de qualidade. Segundo Reyes-Moreno e Paredes-López (1993), é possível que a alteração na cor dos grãos ocorra em virtude da polimerização acelerada de compostos fenólicos de baixo peso molecular (taninos solúveis) a taninos condensados de alto peso molecular e altamente coloridos.

O conteúdo de taninos no tegumento de feijão varia de 0 a 20%, dependendo da espécie e da cor (Kigel, 1999), assim como de um ano e de um local para outro dentro de uma mesma variedade (Ma & Bliss, 1978), demonstrando sofrer um efeito ambiental. São encontrados no tegumento das sementes e muito pouco nos cotilédones, em pouca quantidade ou não-detectável em feijões brancos, seguido dos pretos e dos vermelhos em maior quantidade. Portanto, a qualidade protéica é maior nos feijões branco, preto e vermelho respectivamente (Bressani & Elias, 1980).

Em estudos realizados em feijão-fava, por Duc et al. (1995), não foi possível concluir que ocorrem efeitos pleiotrópicos de genes, que controlam a cor das sementes e o conteúdo de taninos, ou que existe forte ligação entre genes para cor e conteúdo de taninos. Ma e Bliss (1978), observando a frequência de plantas dentro de determinadas classes fenotípicas, baseada em valores de equivalente de catequina, mostraram que a diferença entre os pais não era devido a genes simples. A distribuição contínua sugeriu uma herança de modelo quantitativo. A escolha de classes fenotípicas foi arbitrária, não sendo possível determinar o modo de ação dos genes com os dados obtidos, embora epistasia pudesse estar envolvida.

Os mesmos pesquisadores Ma e Bliss (1978) concluíram que linhas homozigotas, diferindo no conteúdo de taninos, podem ser claramente identificadas e que baixo conteúdo de tanino é dominante sobre alto conteúdo de tanino. Há vários loci, controlando efeitos genéticos diferentes na síntese de

taninos. A cor do tegumento, que é controlada por genes dominantes é normalmente, mas nem sempre, associada a altos conteúdos de taninos.

No Brasil, o feijão colorido tem preferência em relação aos brancos. Neste caso, a aceitabilidade dos feijões é baseada na cor da semente e o conteúdo de taninos não é conhecido. Um estudo genético para seleção e eliminação de taninos pode ser importante do ponto de vista do consumidor e do produtor, com ganhos para ambos do ponto de vista nutricional e comercial, respectivamente.

O desenvolvimento de populações selecionadas constitui o primeiro objetivo do melhoramento. Estimativas de herdabilidade e o avanço genético esperado de características desejáveis são de grande valor para um programa de melhoramento. Para Ramalho et al. (1990), a herdabilidade reflete a proporção de variação fenotípica, que pode ser herdada, ou seja, quantifica a confiabilidade do valor fenotípico como indicador do valor reprodutivo.

É possível estimar dois tipos de herdabilidade: herdabilidade no sentido amplo (h^2_a) e herdabilidade no sentido restrito (h^2_r). Hanson (1963) define herdabilidade no sentido amplo, considerando o genótipo como unidade em relação ao ambiente, ou seja, a variação genética total relacionada com a variação fenotípica. Interações alélicas de dominância e epistáticas, quando transmitidas apenas em parte à progênie, levam à definição de herdabilidade no sentido restrito, em que somente a porção aditiva da variação genética é tomada em relação à variação fenotípica.

Uma observação muito importante é que a herdabilidade não é apenas uma propriedade do caráter, mas, também da população e das condições ambientais a que foram submetidos os indivíduos. Isso quer dizer que a herdabilidade de certa característica não é imutável. Na verdade, a herdabilidade pode ser aumentada tanto pela introdução de variação genética na população quanto pelo aprimoramento das condições experimentais, reduzindo, assim, a contribuição da variação ambiental à variação fenotípica total (Ramalho et al., 1990).

Apesar das diferenças, que ocorrem na herdabilidade de uma dada característica, as estimativas existentes na literatura mostram que cada caráter apresenta uma amplitude de valores da herdabilidade que lhe é peculiar. Assim, a

produção de grãos de uma planta, a produção de ovos das aves ou a produção de leite de bovinos são características, significativamente, influenciadas pelas condições ambientais e apresentam baixa herdabilidade, normalmente, inferior a 40%. Outras características como o peso de sementes, altura de plantas ou o peso dos ovos são menos influenciadas pelo ambiente e apresentam conseqüentemente, maior herdabilidade (Ramalho et al., 1990).

A estimativa do coeficiente de herdabilidade atende a duas finalidades básicas no melhoramento genético, que seriam: demonstrar a relativa facilidade com que diferentes caracteres são selecionados, em um determinado esquema de melhoramento; e permitir que estimativas dos progressos esperados com seleção sejam obtidos (Hanson, 1963).

Segundo Dudley e Moll (1969), uma estimativa de herdabilidade refere-se a uma característica de uma população e é específica para as condições experimentais, nas quais os genótipos foram estudados.

O melhoramento para diminuir fatores antinutricionais, como taninos, pode ser possível em *Phaseolus vulgaris* devido à ampla variação presente no conteúdo de seu conjunto gênico (Kigel, 1999).

Este trabalho teve como objetivo iniciar um estudo genético do conteúdo de taninos presentes no feijão, para uma possível obtenção de linhagens tipo carioca com baixo conteúdo deste elemento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, foi feita a seleção para o genótipo que apresentou menor distância genética com a linhagem AB-74-1-18. A seleção para o material que apresentou menor distância genética com a linhagem AB-74-1-18, constou de linhagens de origem mesoamericana e andina, que, em análises anteriores, não apresentaram taninos em sua constituição (NEP-2, CSW-643, Michelite, KW-780, US-3, AXS-37, Sanilac, Early gallatin e Ouro Branco). O DNA de cada um destes indivíduos foi extraído conforme a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações e amplificado pela técnica de RAPD, utilizando primers polimórficos, que amplificam segmentos de DNA ao acaso. Os primers foram adquiridos junto a Operon Technologies (Alameda, CA, EUA).

Após amplificação, essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%) contendo brometo de etídio, que, após separação eletroforética, foi fotografado sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Os dados de polimorfismo foram registrados como presença (1) ou ausência (0) de bandas entre os diferentes indivíduos, gerando uma matriz de valores binários. As análises de agrupamentos foram realizadas aplicando-se o método do vizinho mais próximo, com base em distâncias genéticas, calculadas pelo quadrado da distância euclidiana para dados binários com auxílio do programa estatístico SPSS para Windows versão 5 (Wilkinson et al., 1992).

A linhagem que apresentou menor distância genética, em relação à carioca AB-74-1-18, para utilização no cruzamento foi a NEP-2.

Neste trabalho, foi realizado cruzamento entre a linhagem de feijão carioca, AB-74-1-18, obtida pelo Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO/UFV), resistente à antracnose e o cultivar NEP-2, com ausência de taninos, selecionado em um primeiro experimento.

A linhagem AB-74-1-18 e o cultivar NEP-2 foram plantados em casa de vegetação do BIOAGRO/UFV e, durante o florescimento, foram realizados os cruzamentos.

As sementes analisadas F_1 foram pré-germinadas em rolos de papel e colocadas em germinador por 48 horas. Em seguida foram semeadas em vasos, sendo obtida a geração F_2 .

As sementes F_2 foram pré-germinadas conforme descrito anteriormente e plantadas, individualmente, em vasos. Todas as plantas F_2 (sementes F_3) foram colhidas e plantadas no Campo Experimental Diogo Alves de Melo, no Campus da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, com parcelas de 1 linha de 1,0 m espaçadas de 0,50 m, com 9 plantas cada (3 covas com 3 sementes) totalizando 132 famílias e os pais, em cada uma das duas repetições. A adubação e os demais tratamentos culturais foram os normalmente recomendados para a cultura, sendo a colheita e a trilha feitas manualmente.

Após a colheita, as amostras de sementes de cada família foram analisadas para determinar o conteúdo de taninos. A metodologia utilizada foi a de Price et al. (1978), utilizando-se 30 sementes de cada família, escolhidas ao acaso e trituradas em multiprocessador. Da farinha obtida, foram retiradas 200 mg para análise. Às 200 mg (semente inteira triturada) foram adicionados 5mL de metanol absoluto. As amostras foram agitadas a 100 rpm, por 20 minutos, a 30⁰C e centrifugadas em 17.200 x g por 15 minutos. Quatro alíquotas de 200 µl do sobrenadante de cada amostra foram pipetadas e transferidas para tubos Eppendorf. Um ml de HCl 4% foi adicionado a um dos tubos para leitura do branco, sendo, então, agitado levemente e colocado em banho-maria a 30⁰ C. Após períodos de 3 minutos, adicionou-se 1mL de Vanilina-HCl (0,5% de vanilina em HCl 4%) a cada um dos 3 tubos referentes às repetições da amostra, agitou-se e levou-se ao banho-maria. Procedeu-se, assim, com todas as amostras. Vinte minutos após o início deste procedimento, iniciou-se a leitura do primeiro tubo colocado no banho-maria, em espectrofotômetro Beckman DU-60 a 500nm, 3 minutos após o tubo seguinte e, assim, sucessivamente.

Os cálculos para determinação de taninos foram feitos utilizando-se de uma curva-padrão de catequina previamente estabelecida. A curva-padrão foi preparada a partir de soluções de diferentes concentrações de D-catequina (0,090–4,068mg/ml). Estas soluções diluídas foram preparadas a partir de uma solução estoque de 45,2 mg de D-catequina em 10 ml de metanol. Uma quantidade de 0,2 ml de cada diluição foi misturado com 1 ml de Vanilina-HCl (0,5% Vanilina em HCl 4%). As absorvâncias foram determinadas a 500 nm.

A equação da curva-padrão estabelecida foi

$$Y = 0,2463x + 0,0706 (R^2=0,992)$$

Os valores determinados pela leitura das amostras em espectrofotômetro (Y) foram levados à curva-padrão. Com o valor encontrado na equação da curva-padrão (x), calculou-se o conteúdo de taninos empregando a seguinte fórmula:

$$\text{mgcat}/100\text{g amostra} = \frac{x \cdot V_i \cdot 100}{m}$$

em que

x= concentração obtida na curva-padrão (mg.ml⁻¹);

V_i = volume inicial da amostra (ml); e

m = peso da amostra (g).

Nota: O resultado obtido em mgcat/100g amostra dividido por 1000 equivale a gcat/100g amostra ou % (percentagem).

Após a análise de variância dos dados, a herdabilidade no sentido amplo foi estimada com base nos componentes de variância segundo Hanson et al. (1956).

As estimativas dos parâmetros genéticos foram obtidas utilizando-se as seguintes expressões:

a) Variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$)

$$\hat{\sigma}_f^2 = \frac{QMT}{r}$$

em que

$\hat{\sigma}_f^2$ = estimador da variância fenotípica nas famílias da população;

QMT = quadrado médio do tratamento; e

r = número de repetições.

b) Variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$):

$$\hat{\sigma}_e^2 = \frac{\text{QMR}}{r}$$

em que

$\hat{\sigma}_e^2$ = estimador da variância ambiental nas famílias da população;

QMR = quadrado médio do resíduo; e

r = número de repetições.

c) Variância genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$)

$$\hat{\sigma}_g^2 = \frac{\text{QMT} - \text{QMR}}{r}$$

em que

$\hat{\sigma}_g^2$ = estimador da variância genotípica nas famílias da população;

QMT = quadrado médio do tratamento;

QMR = quadrado médio do resíduo; e

r = número de repetições.

d) Herdabilidade no sentido amplo (h_a^2)

$$h_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2}$$

em que

h_a^2 = estimador da herdabilidade no sentido amplo;

$\hat{\sigma}_g^2$ = estimador da variância genotípica nas famílias da população; e

$\hat{\sigma}_f^2$ = estimador da variância fenotípica nas famílias da população.

e) Coeficiente de variação genotípica (CV_g)

$$CV_g (\%) = \frac{(100 \sqrt{\hat{\sigma}_g^2})}{m}$$

em que

$CV_g (\%)$ = coeficiente da variação genotípica em porcentagem;

$\hat{\sigma}_g^2$ = estimador da variância genotípica nas famílias da população; e

m = média das famílias da população.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1, encontram-se os resultados obtidos na determinação da distância genética entre linhagens de feijão e a linhagem AB-74-1-18. As linhagens que apresentaram menor distância genética, em relação à carioca AB-74-1-18, para utilização no cruzamento, foram NEP-2 e AXS-37, sendo que foi feita a opção pela NEP-2 devido a uma maior disponibilidade de sementes.

Quadro 1 - Resultados obtidos na determinação da distância genética entre linhagens de feijão e a linhagem AB-74-1-18

	NEP-2	CSW-643	Michelite	KW7-80	US-3	AXS-37	Sanilac	Early gallatin	AB-74-1-18	Ouro Branco
NEP-2	0.000	0.333	0.375	0.481	0.615	0.355	0.313	0.520	0.259	0.429
CSW-643	0.333	0.000	0.533	0.520	0.667	0.517	0.467	0.565	0.600	0.462
Michelite	0.375	0.533	0.000	0.394	0.375	0.135	0.105	0.355	0.394	0.529
KW7-80	0.481	0.520	0.394	0.000	0.333	0.375	0.333	0.231	0.429	0.517
US-3	0.615	0.667	0.375	0.333	0.000	0.419	0.250	0.120	0.630	0.643
AXS-37	0.355	0.517	0.135	0.375	0.419	0.000	0.135	0.333	0.250	0.515
Sanilac	0.313	0.467	0.105	0.333	0.250	0.135	0.000	0.226	0.333	0.471
Early gallatin	0.520	0.565	0.355	0.231	0.120	0.333	0.226	0.000	0.538	0.630
AB-74-1-18	0.259	0.600	0.394	0.429	0.630	0.250	0.333	0.538	0.000	0.586
Ouro Branco	0.429	0.462	0.529	0.517	0.643	0.515	0.471	0.630	0.586	0.000

Na Tabela 1, encontram-se os resultados da análise de variância dos dados obtidos na população F_4 (Apêndice 1), indicando haver diferenças entre as famílias estudadas.

Tabela 1 – Resultados da análise de variância dos dados obtidos na determinação do conteúdo de taninos nas famílias F₄, resultantes do cruzamento das linhagens AB-74-1-18 e NEP-2

FV	GL	QM
Blocos	1	0,0001ns
Tratamentos	133	1,2513**
Genótipos (G)	131	1,2396**
Testemunha (T)	1	3,3344**
GxT	1	0,7078ns
Resíduo	133	0,1221
Total	267	

** significativo a 1% de probabilidade.

ns – não significativo.

CV = 70,5112

\bar{M} Geral = 0,4956

\bar{M} Genótipos = 0,4893

\bar{M} Testemunha = 0,9131

A estimativa de herdabilidade no sentido amplo, para a característica conteúdo de taninos nas famílias F_{3,4}, foi de aproximadamente 90% (Tabela 2), sugerindo que a seleção para esta característica pode ser eficiente nas gerações precoces. Segundo Falconer (1987), as estimativas de herdabilidade superiores a 50% indicam que a contribuição das causas genéticas na expressão fenotípica da característica é mais pronunciada que as atribuídas ao ambiente. Para Hanson (1963), em gerações mais avançadas encontram-se maiores valores para herdabilidade.

É importante ressaltar que a literatura é escassa, relativamente aos estudos genéticos envolvendo conteúdo de taninos em feijão. Informações a respeito de estimativas de herdabilidade são muito importantes para os processos de seleção, em programas de melhoramento de qualquer espécie, pois, possibilitam a avaliação da potencialidade da população para o melhoramento e facilitam as decisões de escolha do método de seleção mais adequado e eficiente.

Tabela 2 – Estimativa de parâmetros genéticos referentes à avaliação do conteúdo de taninos nas famílias da população F₄ resultantes do cruzamento da linhagem AB-74-1-18 com a linhagem NEP-2

Parâmetros	Estimativas
Variância fenotípica	0,6198
Variância ambiental	0,0611
Variância genética	0,5587
Herdabilidade no sentido amplo	0,9015
CV genotípico (%)	152,7596

A herdabilidade deve ser mensurada com base em causas genéticas aditivas, sendo que o resultado encontrado é um bom indicativo da eficiência do processo de seleção, bem como as famílias selecionadas transmitirão a característica para as gerações seguintes.

4. CONCLUSÕES

- ◆ A estimativa de alta herdabilidade no sentido amplo (90,15%), para conteúdo de taninos na geração F4, indica que pode ser feita seleção de genótipos com baixos teores de taninos em gerações precoces.
- ◆ A maior parte da variação observada, para a característica conteúdo de taninos em sementes de feijão, é de origem genética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. The nutritional role of polyphenols in beans. **Polyphenols in cereal and legumes**, Hulse, J. H., Ed., Ottawa, Canada, p.61-72, 1980.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- DUC, G.; BRUN, N.; MERGHEM, R.; JAY, M. Genetic variation in tannin-related characters of faba-bean seeds (*Vicia faba* L.), **Plant Breeding**, v.114, n.3, p.272-274, 1995.
- DUDLEY, J.W.; MOLL, R.H. Interpretation and uses of heritability and genetic variances in plant breeding. **Crop Science**, v.9, n.3, p.257-262, 1969.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 279p.
- HANSON, C.H., ROBINSON, H.F.; COMSTOCK, R.E. Biometrical studies of yield in segregating populations of Korean lespedeza. **Agronomy Journal**, v.48, n.6, p.268-272, 1956.
- HANSON, W.D. Heritability. In: SYMPOSIUM ON STATISTICAL GENETICS AND PLANT BREEDING, Raleigh, 1961. **Statistical genetics and plant breeding**, edited by HANSON, W.D. and ROBINSON, H. F., Washington, NAS/NRC, 1963. p.125-140.
- HERNANDEZ, T.; HERNANDEZ, D.G.; MARTINEZ, C. Polyphenols in alfalfa leaf concentrates. **J. Agric. Food Chem.**, v.39, p.1120-1122, 1991.
- KIGEL, J. Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. **Biotech. Agron. Soc. Environ**, v.3, n.4, p.205-209, 1999.
- MA, Y.; BLISS, F. Tannin content and inheritance in common bean. **Crop Science**, v.18, n.2, p.201-204, 1978.
- PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.** v.26, n.5, p.1214-1218, 1978.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. 2ed. Lavras: Globo, 1990. 359p.

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

SAWAZAKI, H.E.; TEIXEIRA, J.P.F.; MORAES, R. M. D.E.; BULISANI, E.A. Modificações bioquímicas e físicas de feijão durante o armazenamento. **Bragantia**, v.44, n.1, p.375-390,1985.

WILKINSON, L.; HILL, M.; WELNA, J.P. **Statistics**. Chicago; Systat, 1992. 750p.

CAPÍTULO II

CONTEÚDO DE TANINOS EM SEMENTES DE FEIJÃO DO TIPO CARIOCA E SUA RELAÇÃO COM A COR DO TEGUMENTO, TEMPO DE ARMAZENAMENTO E PROCEDÊNCIA DA SEMENTE.

RESUMO

Atualmente, vem crescendo o interesse dos consumidores por produtos que ofereçam melhor qualidade tecnológica. O escurecimento do tegumento do feijão com o tempo após a colheita, possivelmente pela presença dos compostos fenólicos como taninos, influi na qualidade tecnológica dentro do aspecto comercial (não há estabilidade da cor) e também nutricional (taninos podem formar complexos com proteínas tornando-as indisponíveis para o organismo). O conhecimento do comportamento dos genótipos existentes em relação a estas características é a etapa inicial para a obtenção de cultivares melhorados, com ganhos tanto para o produtor quanto para o consumidor. Com este objetivo foram determinados o conteúdo de taninos e a cor do tegumento em 20 linhagens de feijão do tipo carioca, em três períodos: logo após a colheita, aos 6 e 12 meses após e sua possível relação com alterações na cor do grão. Essas mesmas linhagens foram plantadas em três localidades para observação de possíveis modificações no conteúdo de taninos e na cor, em função da mudança de ambiente. A determinação do conteúdo de taninos foi feita utilizando-se do método da Vanilina/HCl, e a cor foi avaliada em colorímetro (Colorquest II do sistema Hunter), com leitura de reflectância. Os dados relativos aos três períodos foram submetidos à análise de variância e de regressão. Para os dados dos três locais de plantio também foi feita análise de variância e teste de médias. Em todas as linhagens foram detectadas alterações no conteúdo de taninos e na cor do tegumento com o armazenamento. O escurecimento do tegumento foi mais intenso nas linhagens Vi0669, OP-S-82, OP-S-193, AN-LAV-51, Talismã e

Pérola. O conteúdo de taninos apresentou valores menores com o armazenamento das sementes, possivelmente pela formação de polímeros de difícil extração. Menores conteúdos foram encontrados nas linhagens VC2, VC3 e VC5, em todos os períodos, com seus tegumentos mantendo-se mais claros que as demais. Concluiu-se que o conteúdo de taninos e a cor do tegumento são características que sofrem influência do ambiente de plantio, para a maioria das linhagens. Alterações na cor do tegumento estão relacionadas com alterações no conteúdo de taninos. As linhagens de feijão carioca com baixos conteúdos de taninos são mais claras e sofrem poucas alterações na cor com o armazenamento.

CHAPTER II

TANNIN CONTENTS IN SEEDS OF THE CARIOCA BEAN AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE TEGUMENT COLOR, STORAGE TIME AND SEED ORIGIN

SUMMARY

The consumers' interest for the products with a better technological quality has been currently increasing. The darkening of the bean tegument along the time after harvesting, probably due to the presence of phenolic compounds such as the tannins, has affected the technological quality related to the commercial aspect (the color unstable) as well as the nutritional one, since tannins may form complexes with the proteins turning them unavailable to the organism. The knowledge of the existent genotypes' behavior in relation to these characteristics is the initial stage for the obtainment of improved cultivars, which will result into gains for both producer and consumer. In the present study, therefore, the tannin contents and the color of the tegument were determined in 20 lines of the carioca bean, over three periods: just after harvesting, at 6 and 12 months after harvesting. In addition, the possible relationships of these variables with the changes in the grain color were also evaluated. The same lines were sown at three places in order to observe the possible modifications in the tannin contents and the color, as a function of the environmental changes. The tannin contents were determined, by applying the Vanillin/HCl method, whereas the color was evaluated in a colorimeter (Colorquest II of the Hunter system), provided with reflectance reading. The data relative to those three periods were subjected to the variance and regression analyses. The data of the three sowing places were submitted to the variance analysis and mean test. In all lines, some alterations were found in both tannin content and tegument color after storage. The darkening of the tegument was more intense in the lines Vi0669, OP-S-82, OP-S-

193, AN-LAV-51, Talismã and Pérola. The content of tannins showed lower values with the storage of the seeds, probably due to the formation of hardly extracted polymers. Lower tannin contents were found in the lines VC2, VC3 and VC5 during all periods, whereas their teguments were kept clearer than the others'. According to the results, the conclusions were drawn as follows. In most lines, the tannin contents and the tegument color are characteristics that are affected by the sowing environment. Changes in the tegument color are related to the alterations in tannin contents. The lines of the carioca bean provided with low tannin contents are clearer and suffer just few alterations in their color when under storage.

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento básico da população brasileira, possuindo significativo teor de proteínas, minerais e vitaminas.

Após a colheita, a respiração e outros processos metabólicos dos grãos continuam ativos, ocasionando, na maioria das vezes, perdas significativas de qualidade. Estes processos podem ser diminuídos, ou retardados, por meio da redução de umidade, que é a forma comercial mais usada; entretanto, mesmo assim, há perdas de peso, consumo de energia pelo processo respiratório e pelo aumento de rachaduras e ocorrência de pragas e fungos. Além disso, após um longo período de armazenamento, ainda pode aumentar a dificuldade de cozimento do feijão, diminuir a germinação e ocorrer escurecimento do tegumento de feijão claro, tipo carioca, depreciando, enormemente, seu valor comercial (Brackmann et al., 2002).

Escurecimento de feijões, durante o armazenamento, constitui um problema econômico, pois, consumidores e processadores relutam em comprar grãos escuros, sendo a cor um parâmetro de qualidade. Estudos recentes estabeleceram que a mudança de cor resulta de uma transformação, induzida pelo calor, de leucoantocianinas incolores para antocianinas altamente coloridas e produtos marrons resultantes de polimerização (Stanley, 1992).

Entretanto, Reyes-Moreno e Paredes-López (1993), demonstraram, em avaliações utilizando colorímetro, que as alterações na cor do tegumento correspondem geralmente a um escurecimento não enzimático de feijões. Atribuíram essas alterações à polimerização acelerada de compostos fenólicos de baixo peso molecular (taninos solúveis) em taninos condensados de alto peso molecular e fortemente coloridos.

Para Iaderoza et al. (1989), o escurecimento do tegumento ocorre devido à presença de compostos fenólicos. Nos últimos anos, as pesquisas se intensificaram a respeito do papel que esses compostos podem ter em leguminosas, especialmente no feijão. Esses compostos ocorrem, naturalmente,

nas sementes de cereais e leguminosas e, quando presentes em grandes quantidades, podem diminuir a biodisponibilidade de proteínas e minerais.

Há diminuição significativa de taninos, principalmente no tegumento, como resultado do armazenamento. Gonzáles (1982), citado por Reyes-Moreno e Paredez-López (1993), detectou diminuição dos taninos condensados, ao longo do tempo de estocagem de feijões.

O conteúdo de taninos no tegumento de feijão varia de 0 a 20%, dependendo da variedade e da cor (Bressani et al., 1982; Kigel, 1999), assim como de um ano e de um local para outro dentro de um mesmo cultivar (Ma & Bliss, 1978). Os taninos são encontrados no tegumento das sementes e, em pequena quantidade, nos cotilédones (Bressani & Elias, 1980).

O objetivo deste trabalho foi determinar mudanças no conteúdo de taninos, após armazenamento, em sementes de vinte linhagens de feijão do grupo carioca, bem como sua possível relação com alterações na cor do tegumento. Estas linhagens foram avaliadas, também, quando plantadas em diferentes locais para observação de efeitos da mudança de ambiente sobre o conteúdo de taninos e cor do grão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 20 linhagens componentes do Ensaio de Valor de Cultivo e Uso do grupo carioca (VCU carioca) do Estado de Minas Gerais. As sementes utilizadas nas análises foram provenientes dos plantios nos municípios de Viçosa, Oratórios e Leopoldina, no ano agrícola de 2002, safra de inverno.

Logo após a colheita, sementes de cada uma das 20 linhagens colhidas em Viçosa, com três repetições, foram separadas e armazenadas em condição ambiente, para coleta dos dados e análise após armazenamento. As análises foram efetuadas nos períodos 1 (logo após a colheita), 2 (6 meses) e 3 (12 meses) de armazenamento.

Para os estudos de efeitos de locais e possíveis interações entre conteúdo de taninos e cor com os locais, foram utilizadas amostras de sementes tomadas por ocasião da colheita (safra de inverno de 2003) nas três localidades.

Determinação do conteúdo de taninos e cor em sementes submetidas a três períodos de armazenamento:

Teste colorimétrico

Este teste foi realizado no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. Foi efetuada a caracterização de cor, para cada linhagem, em colorímetro (Collorquest II do sistema Hunter), com leitura por reflectância das coordenadas L (luminosidade) variando de zero (preto) a 100 (branco), a (intensidade de vermelho e verde) e b (intensidade de amarelo e azul).

Porções das repetições de cada amostra das linhagens foram colocadas em uma cuba de vidro e procedeu-se às leituras no colorímetro. As leituras foram feitas em três períodos: logo após a colheita, 6 e 12 meses de armazenamento. Depois da leitura, as sementes foram novamente armazenadas até o próximo período. Destas mesmas amostras, foram retiradas as sementes para determinação do conteúdo de taninos nos mesmos períodos.

Determinação do conteúdo de taninos

As análises foram realizadas no Laboratório de Enzimologia/Feijão do BIOAGRO/UFV. A metodologia utilizada foi a de Price et al. (1978).

Foram retiradas 30 sementes, ao acaso, de cada uma das linhagens e trituradas em multiprocessador. Pesaram-se 200 mg (semente inteira triturada), sendo adicionados 5 mL de metanol absoluto. Procedeu-se a agitação a 100 rpm, por 20 minutos a 30⁰C e centrifugação a 17200 x g por 15 minutos. Quatro alíquotas de 200 µl do sobrenadante de cada amostra foram pipetadas e transferidas para tubos Eppendorf. Um ml de HCl 4% foi adicionado a um dos tubos para leitura do branco, sendo levemente agitado e colocado em banho-maria a 30⁰C. Após períodos de 3 minutos, adicionou-se aos 3 tubos restantes (repetições) 1ml de Vanilina-HCl, agitou-se levemente e levou-se ao banho-maria a 30⁰C e, assim, sucessivamente com todas as amostras. Vinte minutos após iniciar este procedimento com o primeiro tubo, este foi retirado do banho-maria e iniciou-se a leitura em espectrofotômetro, utilizando-se 1ml da amostra em cubeta de igual volume, com intervalos de 3 minutos. As absorvâncias foram determinadas a 500nm.

Os cálculos para determinação de taninos foram feitos utilizando-se uma curva-padrão de catequina, previamente, estabelecida. A curva-padrão foi determinada a partir de soluções de diferentes concentrações de D-catequina (0,090 – 4,068 mg/ml). Essas soluções diluídas foram preparadas a partir de uma solução estoque de 45,2 mg de D-catequina em 10 ml de metanol. Uma quantidade de 0,2 ml de cada diluição foi misturada com 1 ml de Vanilina- HCl (0,5% vanilina e 4% HCl). As absorvâncias foram determinadas a 500 nm.

A equação da curva-padrão estabelecida foi

$$Y = 0,2463x + 0,0706 (R^2=0,992)$$

Os valores determinados pela leitura das amostras em espectrofotômetro (Y) foram levados à curva-padrão. Com o valor encontrado na equação da curva-padrão (x), calculou-se o conteúdo de taninos empregando a fórmula

$$\text{mgcat}/100\text{g amostra} = \frac{x \cdot V_i \cdot 100}{m}$$

em que

x = concentração obtida na curva-padrão (mgml^{-1});

V_i = volume inicial da amostra (ml); e

m = peso da amostra (g).

Nota: O resultado obtido em $\text{mgcat}/100\text{g}$ amostra dividido por 1000 equivale a $\text{gcat}/100\text{g}$ amostra ou % (percentagem).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições em parcelas subdivididas no tempo.

Determinação de taninos e cor em sementes provenientes de diferentes localidades

As análises do conteúdo de taninos e cor do tegumento das linhagens colhidas em Viçosa, Oratórios e Leopoldina foram realizadas logo após a colheita, sendo que os procedimentos adotados para determinação do conteúdo de taninos e da cor foram os mesmos descritos anteriormente.

Os dados foram submetidos à análise de variância e à comparação das médias por meio do teste de Tukey a 5%. O delineamento experimental adotado foi blocos ao acaso no esquema fatorial (20 linhagens x 3 locais), com 3 repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A) Conteúdo de taninos, períodos de armazenamento e cor do tegumento

Com o armazenamento das amostras de sementes, houve alterações no conteúdo de taninos e na cor do tegumento das linhagens analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da análise de variância do conteúdo de taninos e cor do tegumento em vinte linhagens de feijão-comum, do tipo carioca, em três períodos de armazenamento

FV	GL	QM (taninos)	QM (cor)
Linhagens	19	3,0312**	65,0736**
Erro a	40	0,1710	
Tempo	2	37,9911**	1688,0225**
Interação	38	0,9020**	4,2841**
Erro b	80	0,1356	
Total	179		

** significativo a 1% de probabilidade

\bar{M} taninos = 1,2614

CV taninos (%) = 44,6914

\bar{M} cor = 52,4766

CV cor (%) = 5,0954

O conteúdo de taninos diminuiu com o armazenamento, em todas as linhagens, sendo esta queda mais pronunciada até os 6 meses após a colheita, com certa tendência à estabilidade a partir desta época até os 12 meses (Figura 1). As exceções encontradas, em relação a este comportamento, foram às linhagens OP-S-16, CNFC 8017 e Talismã (Figura 1), em que o conteúdo de taninos praticamente não variou com o tempo. Há, portanto, uma tendência destas linhagens a apresentarem-se mais estáveis quanto a esta característica.

Uma diminuição no conteúdo de taninos nas sementes com o armazenamento foi constatada por diversos pesquisadores. Iaderoza et al. (1989) observaram uma diminuição no conteúdo de taninos condensados, após 6 meses de armazenamento, a qual foi atribuída à oxidação ou formação de complexos

destes elementos com outros componentes do grão. O armazenamento em condições tropicais reduziu a concentração de taninos de feijões pretos, provavelmente, como resultado de uma condensação no revestimento das sementes e, ou sua migração para o cotilédone (Stanley, 1992). Chavan et al. (1979), observaram decréscimo no conteúdo de polifenóis em sementes de sorgo, durante o armazenamento e atribuíram-na à susceptibilidade das polimerizações dos compostos fenólicos presentes no grão, dando origem a polímeros insolúveis de alto peso molecular.

O que efetivamente deve ocorrer, durante o armazenamento, não é uma diminuição no conteúdo de taninos nas sementes, mas uma mudança na estrutura da molécula de taninos, que pode formar complexos com proteínas (Bressani & Elias, 1980) e íons como o ferro (Brune, 1991) ou formar polímeros de alto peso molecular (De León et al., 1989). Desta forma, a metodologia usualmente utilizada na extração de taninos é inoperante. Estes polímeros são muito estáveis e altamente coloridos, causando o escurecimento da semente.

A cor do tegumento não se manteve ao longo do tempo. Alterações na coloração e no conteúdo de compostos fenólicos, durante o armazenamento, provavelmente não sejam devidas a reações enzimáticas (Iaderoza et al., 1989). As linhagens VC2, VC3 e VC5 (Figura 1), que apresentaram uma coloração mais clara logo após a colheita, continuaram apresentando este comportamento em relação às demais, após o armazenamento, mas mesmo assim apresentaram certo escurecimento. Apresentaram, também, menores conteúdos de taninos desde o início do armazenamento (Tabela 2). Isto leva a supor que existe uma relação entre conteúdo de taninos e cor do tegumento. Linhagens com alto conteúdo de taninos apresentam-se mais escuras logo após a colheita, mantendo esta tendência até o final do armazenamento (Figura 2).

As linhagens VC1, VC3, Vi4899, OP-S-30, CII-H-4-12 e Talismã apresentaram aumento no conteúdo de taninos, após 6 meses de armazenamento. As prováveis explicações para este aumento podem ser a ocorrência de síntese de taninos, devido à hidrólise de proteínas que liberam aminoácidos precursores de

compostos fenólicos, ou a metodologia que não é muito precisa e é afetada por vários fatores.

Tabela 2 - Conteúdo de taninos (gcat/100g de amostra) e cor do tegumento, em vinte linhagens de feijão do tipo carioca, em três períodos de armazenamento

Linhagens	Taninos (g/100g)			Cor		
	Colheita	6 meses	12 meses	Colheita	6 meses	12 meses
VC1	3,57AB	0,43BCD	0,50CDEF	58,32BC	51,80BC	46,09BCDE
VC2	0,80F	0,00D	0,00F	61,16A	60,99A	53,78A
VC3	0,86F	0,00D	0,23DEF	61,04A	59,86A	53,59A
VC4	4,07A	1,41ABC	1,02ABCDEF	56,33C	51,79BC	45,43CDE
VC5	0,81F	0,02D	0,00F	62,29A	59,75A	53,35A
Vi0669	2,19CDE	1,32ABC	0,69ABCDEF	57,07C	52,16B	46,64BCDE
Vi4899	2,80BCD	0,94ABCD	1,36ABCD	57,47BC	52,31B	47,41BCD
Vi4599	3,57AB	0,88BCD	0,20EF	57,23BC	50,52BCD	47,29BCD
OP-S-30	2,37CDE	0,42CD	0,72ABCDEF	57,58BC	49,83BCD	45,97BCDE
OP-S-82	1,53EF	0,95ABCD	0,11EF	57,52BC	49,75BCD	44,95DE
OP-NS-331	2,40CDE	1,43ABC	1,23ABCDE	56,38C	50,16BCD	45,03CDE
OP-S-16	1,51EF	1,57AB	1,40ABC	56,52C	50,16BCD	45,86CDE
OP-S-193	1,48EF	0,74BCD	0,35CDEF	57,11C	49,37CD	45,22CDE
AN-LAV-51	2,82BCD	1,47ABC	0,65BCDEF	57,32BC	50,22BCD	45,34CDE
CIII-R-3-19	1,72DEF	0,72BCD	0,13EF	57,31BC	51,00BCD	47,68BC
CII-H-4-12	3,29ABC	1,42ABC	1,71AB	58,24BC	50,51BCD	47,19BCD
CNFC 9437	1,61EF	0,56BCD	0,00F	59,90AB	51,70BC	48,57B
CNFC 8017	1,84DEF	2,05A	1,80A	55,65C	48,65D	44,48E
Talismã	1,91DEF	1,36ABC	1,40ABC	57,31BC	50,36BCD	46,56BCDE
Pérola	2,20CDE	1,01ABCD	0,13EF	57,71BC	50,49BCD	47,32BCD

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

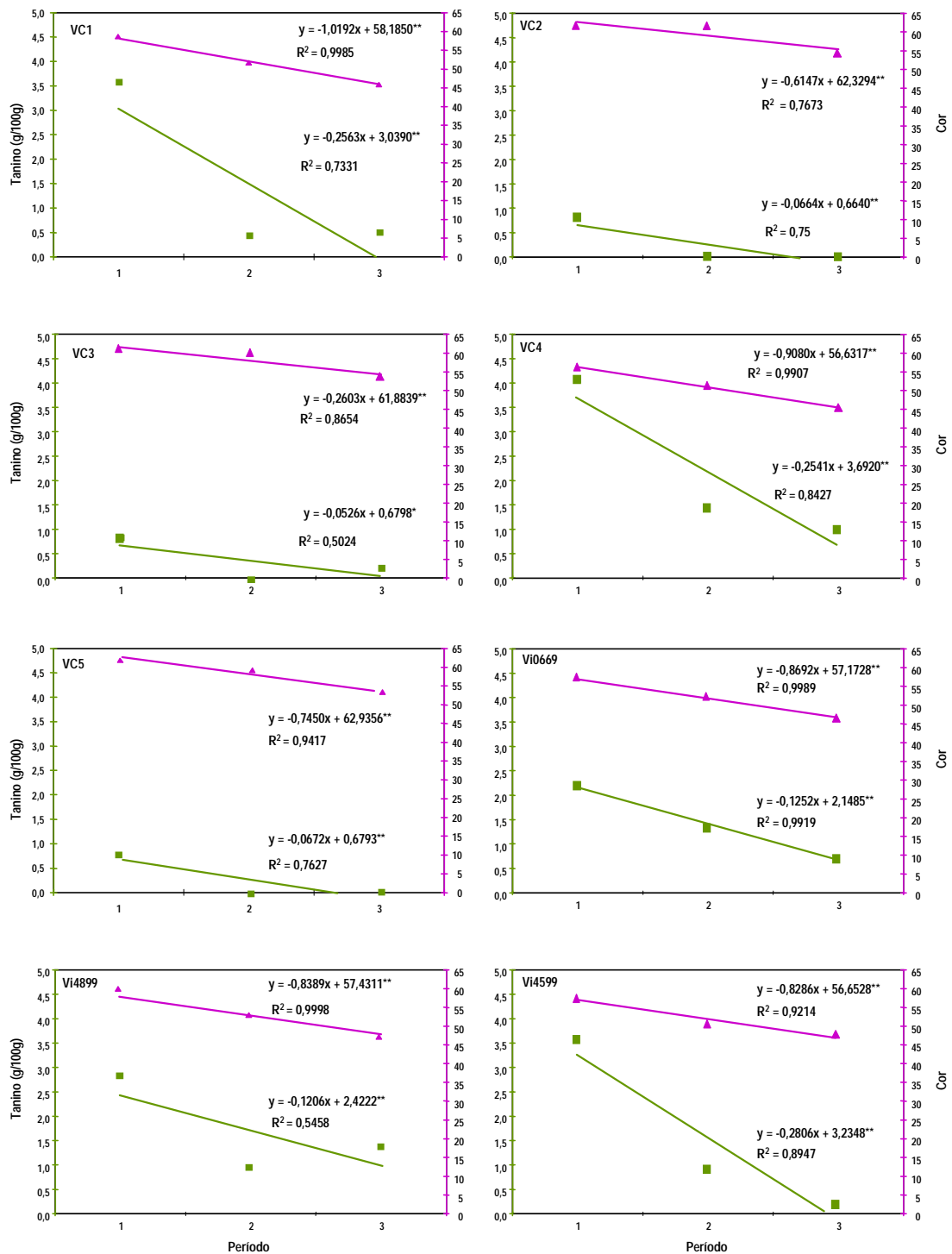


Figura 1 - Alterações no conteúdo de taninos e na cor do tegumento das 20 linhagens, em três períodos de armazenamento.

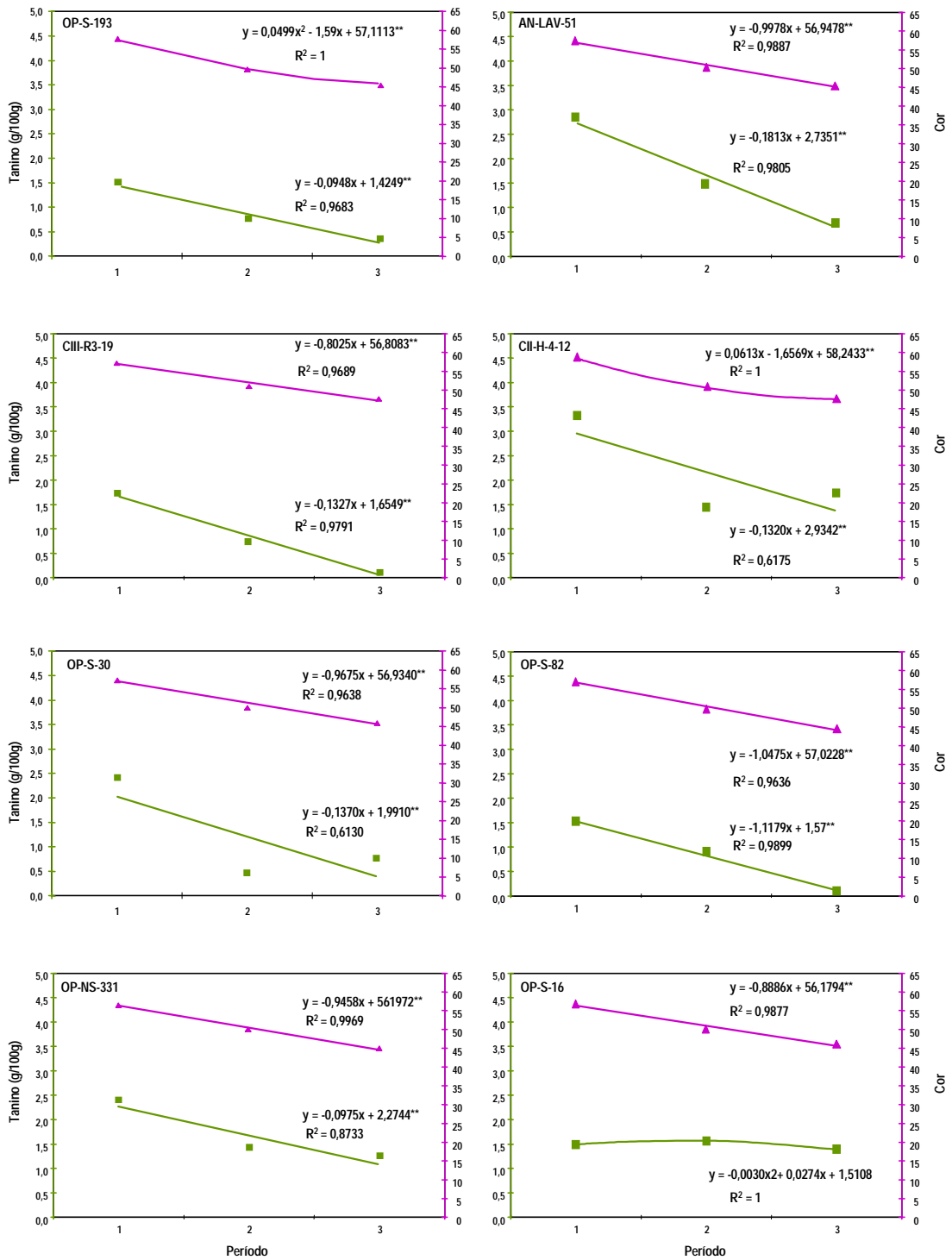


Figura 1 – Continuação...

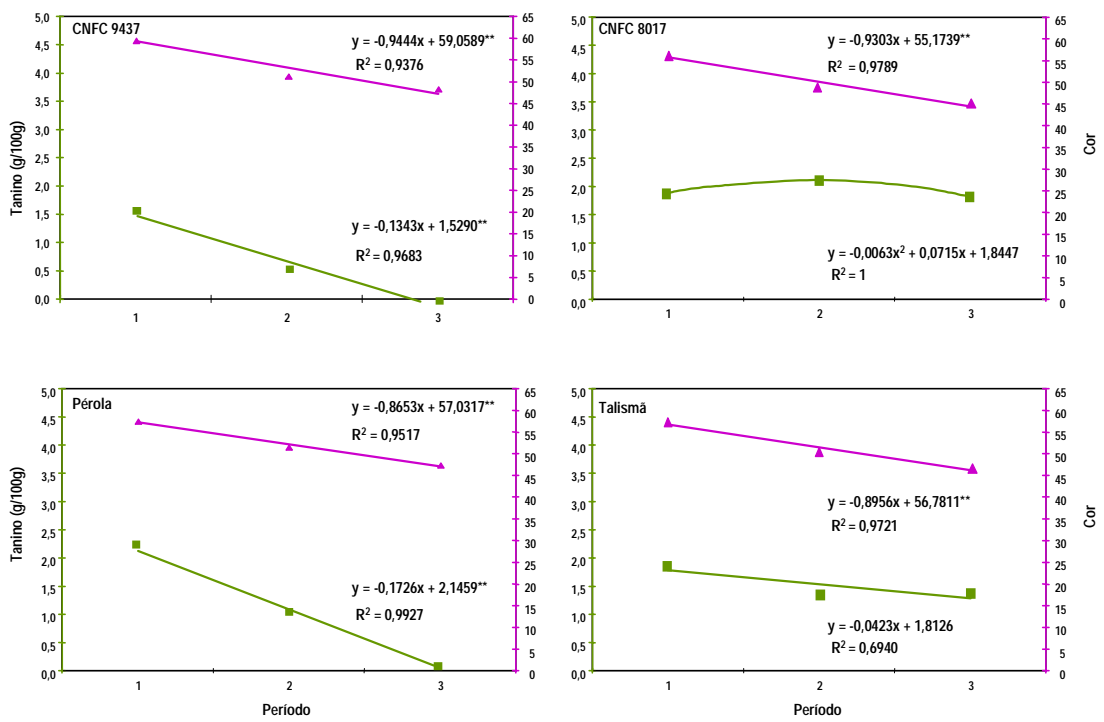


Figura 1 - Continuação...

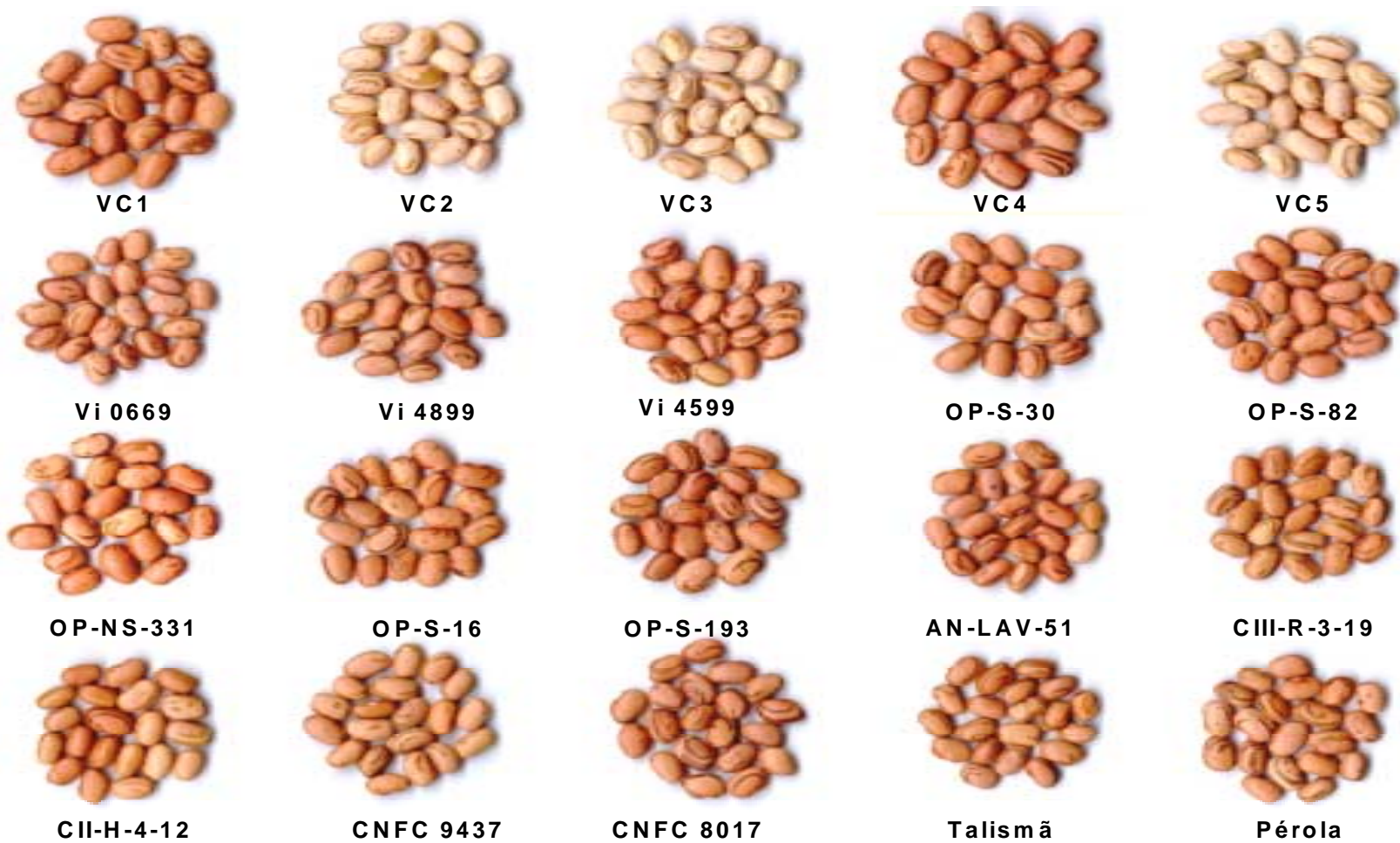


Figura 2 - Aspecto da cor do tegumento das 20 linhagens estudadas após período de um ano armazenadas.

B) Conteúdo de taninos, locais de produção e cor do tegumento das sementes

Para quase todas as linhagens, as diferentes origens de plantio tiveram influência no comportamento das linhagens quanto ao conteúdo de taninos e cor do tegumento (Tabela 3), confirmando que o conteúdo de taninos pode variar de um local para outro dentro de uma mesma variedade, conforme constatado por Ma e Bliss (1978).

Uma provável explicação para esta variação de um local para outro é que os taninos condensados são constituídos de unidades de flavonóides. Os flavonóides são antocianinas e antoxantinas (pigmentos). As antocianinas estão extremamente relacionadas aos taninos, usualmente sem cor, sendo que diferentes antocianinas são responsáveis pelas cores do tegumento de feijões. A concentração de flavonóides nas sementes varia de acordo com as condições de crescimento e colheita (Staton & Francis, 1966). Assim, uma mesma variedade pode apresentar estas alterações, quando cultivada em localidades diferentes.

Tabela 3 – Resultados da análise de variância do conteúdo de taninos e da cor do tegumento de 20 linhagens de feijão do tipo carioca, cultivadas em três diferentes localidades

FV	GL	QM (taninos)	QM (cor)
Blocos/locais	6	0,1176	0,7329
Blocos	2	0,2496	0,1380
Blocos x locais	4	0,0516	1,0303
Linhagens (L)	19	4,6161*	17,1401**
Locais (Loc)	2	17,8065*	1466,0848**
LxLoc	38	0,9354*	6,4274**
Resíduo	114	0,2305	0,7209
Total	179		

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\bar{M} Taninos = 1,5589

CV Taninos (%) = 30,8007

\bar{M} Cor = 54,4579

CV Cor (%) = 1,5592

As linhagens VC2, VC3, VC4, VC5, OP-S-82, OP-S-193, CNFC9437, CNFC8017, Talismã e Pérola não apresentaram diferenças quanto ao conteúdo de taninos (Tabela 4) nos três locais de plantio, mas não tiveram o mesmo comportamento quanto à cor (Tabela 5).

Quando se analisou, separadamente, o comportamento das linhagens em cada um dos locais de plantio, constatou-se que as linhagens VC2, VC3 e VC5 apresentaram, nos três locais, menor conteúdo de taninos (Tabela 4). Estas três linhagens, além de menor conteúdo de taninos, também mantiveram-se mais estáveis quanto a esta característica quando mudou o local de plantio.

O comportamento das linhagens VC1, VC3, VC4, OP-S-193, CII-H-4-12, CNFC9437 e CNFC8017 foi diferente quanto à cor do tegumento, em todos os três locais de plantio (Tabela 5). Em todas as demais linhagens, exceto VC1, VC3, VC4, VC5, OP-S-30, OP-S-193, CII-H-4-12 e CNFC9437, não houve diferenças na cor do tegumento das sementes colhidas em Viçosa e Oratórios. As linhagens VC2, VC3 e VC5 apresentaram tegumento mais claro que as demais, nos três locais de plantio (Tabela 5).

As sementes colhidas em Leopoldina apresentaram coloração mais escura que nos outros locais (Tabela 5). Provavelmente, isto ocorreu devido ao atraso na colheita neste local, o que fez com que essas sementes tivessem um período maior de permanência no campo. Conforme dito anteriormente, o escurecimento do tegumento pode já estar ocorrendo no campo e, ou com o tempo de armazenamento.

Tabela 4 - Conteúdo de taninos (gcat/100g de amostra) em sementes de vinte linhagens de feijão do tipo carioca, provenientes de três localidades de plantio, safra de inverno de 2003

Linhagens	Locais					
	Viçosa		Oratórios		Leopoldina	
VC1	3.5748 a	AB	3.1750 a	A	1.2397 b	BC
VC2	0.7968 a	E	0.0020 a	D	0.0023 a	D
VC3	0.8611 a	E	0.0007 a	D	0.0017 a	D
VC4	4.0722 a	A	1.9367 b	ABC	1.6813 b	ABC
VC5	0.8092 a	E	0.0003 a	D	0.0010 a	D
Vi0669	2.1869 a	BCD	2.5168 a	AB	0.6122 b	CD
Vi4899	2.8033 a	ABCD	1.7458 b	BC	1.3646 b	BCD
Vi4599	3.5669 a	AB	1.0949 b	BC	0.6898 b	CD
OP-S-30	2.3680 a	BCD	0.9747 b	CD	0.5468 b	CD
OP-S-82	1.5287 a	D	1.1023 a	BC	0.8172 a	CD
OP-NS-331	2.4030 a	BCD	1.4184 b	BC	1.4540 b	BC
OP-S-16	1.5108 ab	D	1.9601 a	BC	0.6922 b	CD
OP-S-193	1.4842 a	D	0.8888 a	CD	1.2148 a	BCD
AN-LAV-51	2.8238 a	ABCD	1.6913 b	BC	2.2604 ab	AB
CIII-R-3-19	1.7220 a	D	1.6705 a	BC	0.7018 b	CD
CII-H-4-12	3.2942 a	ABC	1.6347 b	BC	3.0108 a	A
CNFC9437	1.6132 a	D	1.8645 a	ABC	1.1197 a	BC
CNFC8017	1.8447 a	D	1.3389 a	BC	1.0824 a	BC
Talismã	1.9098 a	CD	1.1400 a	BC	1.9704 a	ABC
Pérola	2.1973 a	BCD	1.6051 a	BC	1.9357 a	AB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si. (Teste de Tukey, 0,05).

\bar{M} Viçosa = 2,1686

\bar{M} Oratórios = 1,3881

\bar{M} Leopoldina = 1,1199

Tabela 5 - Médias de leituras da cor do tegumento de sementes de vinte linhagens de feijão do tipo carioca, provenientes de três localidades de plantio

Linhagens	Locais					
	Viçosa		Oratórios		Leopoldina	
VC1	58.2533 a	BC	55.8033 b	BC	49.0533 c	BCD
VC2	61.1567 a	A	60.1033 a	A	52.5067 b	A
VC3	61.0367 a	A	54.8867 b	A	52.2867 c	A
VC4	56.3267 b	CD	60.5833 a	BCD	48.0033 c	BCDE
VC5	62.2933 a	A	57.3333 b	B	52.6267 c	A
Vi0669	57.0733 a	CD	56.7167 a	BC	47.1400 b	CDE
Vi4899	57.4733 a	BCD	56.8767 a	BC	48.3533 b	BCDE
Vi4599	57.2333 a	CD	56.6833 a	BC	47.7200 b	BCDE
OP-S-30	57.5833 b	BCD	60.3200 a	A	47.8500 c	BCDE
OP-S-82	57.5167 a	BCD	55.9000 a	BC	46.4300 b	E
OP-NS-331	56.3800 a	CD	55.9367 a	BC	48.5100 b	BCDE
OP-S-16	56.5233 a	CD	55.4567 a	BC	47.5900 b	BCDE
OP-S-193	57.1133 a	CD	54.8033 b	CD	48.1833 c	BCDE
AN-LAV-51	57.3167 a	CD	56.5933 a	BC	48.3200 b	BCDE
CIII-R-3-19	57.3067 a	CD	56.8167 a	BC	48.0667 b	BCDE
CII-H-4-12	58.2433 a	BC	54.8633 b	BCD	48.4467 c	BCDE
CNFC9437	59.9033 a	B	55.4833 b	BC	49.5733 c	BC
CNFC8017	55.6467 a	D	52.6933 b	D	48.7700 c	BCDE
Talismã	57.3067 a	CD	56.9467 a	BC	46.9867 b	DE
Pérola	57.7067 a	BCD	57.1767 a	BC	49.6867 b	B

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si. (Tukey, 0,05).

4. CONCLUSÕES

As conclusões para as linhagens de feijão-comum, do tipo carioca são apresentadas a seguir.

- ◆ Com o armazenamento, os valores encontrados para conteúdo de taninos diminuíram em todas as linhagens, possivelmente devido à formação de polímeros e, ou complexos.
- ◆ Em todas as linhagens, foram detectadas alterações na cor do tegumento (escurecimento) com o armazenamento.
- ◆ Os menores conteúdos de taninos foram encontrados nas linhagens VC2, VC3 e VC5, em todos os períodos de armazenamento e locais de plantio, sendo que seus tegumentos mantiveram-se mais claros que aqueles das outras linhagens.
- ◆ O conteúdo de taninos e a cor do tegumento são características influenciadas pelo ambiente de cultivo, na maioria das linhagens.
- ◆ Alterações na cor do tegumento estão relacionadas às mudanças detectadas no conteúdo de taninos. As linhagens de feijão tipo carioca com baixo conteúdo de taninos são mais claras e sofrem poucas alterações na cor, com o tempo de armazenamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRACKMANN, A.; NEUWALD, D.A.; RIBEIRO, N.D.; FREITAS, S.T. Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca em armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.911-915, 2002.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. The nutritional role of Polyphenols in beans. **Polyphenols in cereal and legumes**, Hulse, J. H., Ed., Ottawa, p.61-72, 1980.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; BRAHAM, J.E. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. **J. Plant Foods**, v.4, p.43-55, 1982.
- BRUNE, M. Determination of iron binding phenolic groups in foods. **J. Food Science**, v.56, n.1, p.128-131, 1991.
- CHAVAN, J.K.; GHONSIKAR, C.P.; KADAM, S.S. & SALUNKHE, D.K. Protein and starch changes in developing seeds of low and high tannin cultivars of sorghum. **J. Food Bioch.**, v.3, n.1, p.13-20, 1979.
- DE LEON, L.; BRESSANI, R.; ELÍAS, L. G. Effect of seed coat on the hard-to-cook phenomenon of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.39, n. 3, p.405-418, 1989.
- IADEROZA, M.; SALES, A.M.; BALDINI, V.L.S.; SARTORI, M.R.; FERREIRA, V.L.P. Atividade de polifenoloxidase e alterações da cor e dos teores de taninos condensados em novas cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante o armazenamento. **Coletânea ITAL**, v.19, n.2, p.154-164, 1989.
- KIGEL, J. Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. **Biotech. Agron. Soc. Environ**, v.3, n.4, p.205-209, 1999.
- MA, Y.; BLISS, F. Tannin content and inheritance in common bean. **Crop Science**, v.18, n.2, p.201-204, 1978.
- PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.** V.26, n.5, p.1214-1218, 1978.
- REYES-MORENO, C.; PAREDES-LOPEZ, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.3, p.227-286, 1993.

STANLEY, D.W. A possible role for condensed tannins in bean hardening. **Food Research International**, v.5, n.3, p.187-192, 1992.

STANTON, W.R.; FRANCIS, B.J. Ecological significance of anthocyanins in the seed coats of the Phaseoleae. **Nature**, v.211, n.1, p.970-971, 1966.

CAPÍTULO III

ALTERNATIVAS DE AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DO CONTEÚDO DE TANINOS EM SEMENTES DE FEIJÃO

RESUMO

A literatura para metodologia de determinação do conteúdo de taninos é diversa e às vezes conflitante. Além da falta de uma metodologia padrão, em muitos casos dispõe-se de poucas sementes para se proceder à determinação do conteúdo de taninos e estas não podem ser destruídas, pois, posteriormente serão plantadas, como no caso de estudos genéticos desta característica. Os taninos localizam-se em maior quantidade no tegumento das sementes e muito pouco nos cotilédones, em pouca quantidade ou não detectável em feijões brancos, seguidos dos pretos e dos vermelhos com maior quantidade. Considerando-se estas características, foram experimentadas alternativas de obtenção de amostra para sua determinação. Utilizou-se para isto sementes de feijão de três cultivares com cores do tegumento e conteúdos de taninos diferentes: vermelho, com maior conteúdo, grão tipo carioca com conteúdo médio e grão branco com ausência ou baixo conteúdo. Os procedimentos de obtenção das amostras foram três: parte do tegumento retirado e triturado (microanálise), todo o tegumento retirado, liofilizado e triturado e toda a semente triturada (procedimento mais utilizado). Utilizou-se o método da Vanilina-HCl, com três repetições. Constatou-se que a análise de todo o tegumento liofilizado e triturado é eficiente para determinação do conteúdo de taninos e para classificação dos cultivares, apresentando valores mais precisos. A utilização da semente inteira triturada separa cultivares distintos quanto ao conteúdo de taninos, porém seus valores são subestimados. A microanálise pode ser utilizada como um procedimento não destrutivo para constatação da presença ou ausência de taninos, sem quantificá-los.

CHAPTER III

THE SAMPLING ALTERNATIVES FOR ANALYZING THE TANNIN CONTENTS IN BEAN SEEDS

SUMMARY

The available literature concerning to the methodology for determination of tannin contents is diverse and sometimes conflicting. Besides the lack of a pattern methodology, in many cases a few seeds are available for proceeding to the determination of tannin contents. In addition, these seeds cannot be destroyed, since later they will be sown, such as in the case of the genetic studies about this characteristic. A higher tannin quantity are located in the tegument of the seeds, but very few in cotyledons, just a few quantity or non-detectable in the white beans, following the black and the red ones with higher quantities. Taking these characteristics into account, some alternatives for the obtainment of samples were experienced, which would allow for the tannin determination. So, a number of seeds of three bean cultivars showing different tegument colors and tannin contents: red tegument with higher tannin content, carioca grain with average content, and white grain with absence or lower tannin content. The procedures for obtaining the samples were: a tegument part that was removed and triturated (microanalysis); the whole tegument was removed, lyophilized and triturated; and the whole seed was triturated (most used procedure). The Vanillin-HCl method was applied, with three replicates. It was found that the analysis of the whole lyophilized and triturated tegument is efficient for determination of the tannin contents in order to classify those cultivars presenting more accurate values. When using the whole triturated seed, the different tannin contents are separated, but their values are underestimated. The microanalysis might be used as a non-destructive procedure for verification of the presence or absence of tannins, but the quantification of these tannins is not possible to be performed.

1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são um grupo de metabólitos secundários, estando amplamente distribuídos no reino vegetal em quase todas as plantas. Compostos fenólicos são componentes de alimentos de origem, exclusivamente, vegetal.

Os efeitos danosos dos taninos em dietas dizem respeito à sua interação com proteínas. Complexo tanino-proteína é responsável pela diminuição no crescimento, baixa digestibilidade protéica e aumento do nitrogênio fecal. Taninos são também inibidores de importantes enzimas digestivas, como tripsina e amilases (Deshpande & Salunkhe, 1985).

Taninos têm sido apontados como carcinogênicos. Reddy et al. (1985) e Salunkhe et al. (1982) sugerem uma possível correlação entre consumo usual de vegetais ricos em taninos condensados com a incomum frequência de câncer no esôfago e na boca.

Devido ao conhecimento dos efeitos adversos de taninos, torna-se necessário aumentar os conhecimentos relacionados à sua entrada em dietas. Entretanto, a maior dificuldade encontrada na pesquisa de compostos fenólicos é a carência de um método quantitativo padrão para a análise destes, que seja adequado a uma ampla classe de sementes, forragens e produtos alimentícios, em diferentes condições ambientais. Além disso, alguns métodos para análise de taninos medem compostos fenólicos totais, que podem não ser um índice verdadeiro de seus efeitos adversos para a qualidade nutricional de alimentos. (Deshpande et al., 1986).

Os taninos de cereais e leguminosas consistem de uma série de fenóis poliméricos. Taninos hidrolisáveis são aparentemente ausentes, tampouco glicose ou outro açúcar é encontrado após hidrólise. A extração quantitativa de taninos condensados de tecidos de plantas é sempre difícil, devido à sua união com carboidratos ou matrizes protéicas. O tanino existente ligado aos grânulos de proteínas durante o processamento não é solúvel, nem extraível e, portanto, não é medido. Como regra geral, material vegetal é primeiramente extraído com um solvente polar para remover gorduras, ceras, clorofila e carotenóides. Em

seguida, os taninos são extraídos com solvente adequado, usualmente metanol em HCl 1% ou acetona 70% (Leung et al., 1979).

A literatura referente à metodologia de trabalho com taninos é diversa e, às vezes, conflitante. Os métodos disponíveis para análise de taninos variam de simples colorimétrico a espectrofotometria UV, cromatografia e enzimático. Nenhum destes métodos pode ser aplicado a diferentes produtos alimentícios, com o mesmo nível de sucesso (Deshpande et al., 1986).

Os métodos mais comuns para leguminosas e cereais são os testes de Vanilina, Azul da Prússia e Folin-Denis. O método Azul da Prússia e o Folin-Denis não são específicos para detectar todos os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) com variações na sensibilidade. Portanto, para avaliação de taninos condensados em vegetais, o teste de Vanilina é preferido devido sua especificidade, sensibilidade e simplicidade (Sarkar & Howarth, 1976).

Price et al. (1978) avaliaram, detalhadamente, vários fatores que influenciam o método da Vanilina. Alguns desses fatores são: tempo e meio de extração, conhecimento da cor da amostra, adequação da Catequina aos padrões de referência, concentração de Vanilina e HCl, temperatura e reprodutibilidade do método e variação dos resultados em função do tempo entre a moagem da amostra e a análise. Com base nestas observações, os autores sugerem uma adequação nos procedimentos, para o método da Vanilina, para determinação do conteúdo de taninos em sorgo, a fim de obter a reprodutibilidade desejada. Esses procedimentos também são adotados para cereais e leguminosas.

A despeito de numerosas modificações, o método da Vanilina ainda assim não é específico para polifenóis, que são taninos. Entretanto, dentro da reduzida especificidade do reagente e de certas restrições das condições de reação, o método da Vanilina parece ser um procedimento reprodutível e viável (Deshpande et al., 1986).

Segundo Deshpande e Cheryan (1985), a determinação do conteúdo de taninos em tecidos de plantas é bastante problemática e, grandemente, influenciada por:

1 – Tamanho da partícula da amostra - constatou-se que quanto menor a granulometria da farinha de feijão, menor o teor de taninos encontrado.

2 – Tempo de preparo e extração - muitos fenóis tendem a oxidar-se durante a preparação e extração da amostra e, por este motivo, longo tempo de extração resulta em diminuição do valor estimado de taninos.

3 – Umidade relativa - há decréscimo nos valores de taninos encontrados quando as sementes são armazenadas em condições de alta umidade relativa. Isto ocorre em laboratórios, onde estas condições não são controladas, assim como em condições de tempo com alta umidade, particularmente nos meses de verão.

4 –Repetibilidade - há ocorrência de variação nos valores de taninos de um dia para outro, em que foi feita a análise, em um mesmo lote, sendo os parâmetros controlados.

5 – Tempo máximo para desenvolvimento da cor - o tempo decorrido, após o contato da Vanilina com a amostra, deve ser de 10 a 20 minutos. Com um tempo maior, os valores tendem a decrescer, presumivelmente, pela oxidação dos taninos.

6 – Efeito da variação de cor em um mesmo lote - se forem analisadas separadamente, sementes de um mesmo lote apresentarão valores diferentes para taninos. A variação natural da cor dentro de um lote é, aparentemente, o fator que mais influencia a avaliação de taninos. Taninos são compostos coloridos, presentes quase que exclusivamente no tegumento do grão. O tanino presente nos cotilédones está ligado a proteínas e, normalmente, não é extraível.

Cultivares de feijão, cultivados em diferentes condições ambientais, necessitam ser classificados quanto à presença e tipo de taninos condensados, priorizando o desenvolvimento de uma metodologia padronizada, que possibilite a comparação de resultados entre laboratórios. A padronização é, também, um meio de determinar a influência de taninos na qualidade nutricional de legumes.

Além da falta de uma metodologia padrão, em muitos casos dispõe-se de poucas sementes para proceder à determinação de taninos, sendo que estas não podem ser destruídas, pois, posteriormente serão plantadas, como no caso de estudos genéticos desta característica.

Os taninos localizam-se em maior quantidade no tegumento das sementes, conforme mostraram os estudos feitos por Desphande et al. (1982), em que a remoção da casca de cultivares de feijão levou a uma redução de 68 a 95% no conteúdo de taninos. Levando-se em conta esta característica, o objetivo do presente trabalho foi experimentar metodologias alternativas para obtenção de amostras das sementes, que expressem, com maior exatidão, o conteúdo de taninos na semente de feijão. Foram realizados testes, retirando-se parte do tegumento da semente (microanálise), todo o tegumento e utilizando-se toda semente triturada e também as possíveis implicações na adoção de um procedimento não destrutivo (microanálise).

2. MATERIAL E MÉTODOS

A análise para determinação de taninos foi realizada no Laboratório de Enzimologia / Feijão nas dependências do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV. Foram utilizadas sementes de feijão com três cores de tegumento: vermelho, bege com rajas marrons (tipo carioca) e branco. Nos cultivares escolhidos, foram encontrados diferentes conteúdos de taninos, sendo que o cultivar de grãos vermelhos apresentou um valor mais alto, o do tipo carioca um valor médio, enquanto o de grãos brancos não continha taninos. O método utilizado foi o de Price et al. (1978), com algumas adaptações.

Amostras de sementes dos cultivares foram divididas em três grupos de 30 sementes. De um dos grupos, retirou-se parte do tegumento (microanálise) com auxílio de uma lâmina. No segundo grupo, as sementes foram mantidas imersas em água deionizada por 24 horas; em seguida, o tegumento foi retirado e liofilizado, juntamente com a água. No terceiro grupo, as sementes inteiras foram trituradas em multiprocessador.

Microanálise (utilização de parte do tegumento)

Inicialmente, foram preparadas soluções de HCl 4%, Vanilina-HCl (0,5% Vanilina +4% HCl). Parte do tegumento de 30 sementes, de cada cultivar a ser analisado, foi retirado e triturado com auxílio de uma lâmina. Quatro porções de 5mg de cada variedade foram colocadas em tubos Eppendorf, onde se adicionou 125 µl de metanol absoluto. Em seguida, foram colocados em agitador a 75 rpm, por 20 minutos, a 30⁰C. Logo após, foram centrifugados por 10 minutos a 6000 rpm, em microcentrífuga Eppendorf 5415C. Transferiram-se 40 µl do sobrenadante de cada tubo para novos tubos (um para leitura do branco e 3 outros para repetições da amostra). Respeitando-se intervalos de 3 minutos para cada tubo, ao tubo para leitura do branco foram adicionados 200 µl de HCl 4% e às repetições das amostras 200 µl de Vanilina-HCl, sempre agitando, durante poucos segundos, em Vortex e colocando cada tubo em banho-maria a 30⁰C. Decorridos 20 minutos, após iniciado esse procedimento com o primeiro

tubo, iniciou-se a leitura em espectrofotômetro Beckman DU-60 a 500nm, com a transferência de 50 µl da amostra contida no tubo para uma cubeta de igual volume, respeitando-se intervalos de 3 minutos entre cada leitura.

Os cálculos para determinação do conteúdo de taninos foram feitos utilizando-se uma curva-padrão de catequina previamente estabelecida. A curva-padrão foi preparada a partir de soluções com diferentes concentrações de D-catequina (0,09–4,07 mg/ml). Essas soluções diluídas foram preparadas a partir de uma solução estoque de 45,2 mg de D-catequina em 10 ml de metanol. Uma alíquota de 0,2 ml de cada diluição foi misturada com 1 ml de Vanilina- HCl (0,5% Vanilina e 4% HCl). As absorbâncias foram determinadas a 500 nm.

A equação da curva-padrão estabelecida foi

$$Y = 0,2463x + 0,0706 \quad (R^2 = 0,992).$$

Os valores determinados pela leitura das amostras em espectrofotômetro (Y) foram levados à curva-padrão. Com o valor encontrado na equação da curva-padrão(x) foi calculado o conteúdo de taninos pela seguinte fórmula:

$$\text{mgcat}/100\text{g amostra} = \frac{x \cdot V_i \cdot 100}{m}$$

em que

x = concentração obtida na curva-padrão (mgml^{-1});

V_i = volume inicial da amostra (ml); e

m = peso da amostra (g).

Nota: O resultado obtido em mgcat/100g de amostra dividido por 1000 equivale a gcat/100g amostra ou % (percentagem) de taninos.

Análise de todo tegumento

Quatro amostras de 30 sementes de cada cultivar foram colocadas em recipientes, sendo adicionados 15 ml de água deionizada em cada um. Após 24 horas, retirou-se todo o tegumento das sementes e, juntamente com a água restante, transferiu-se para um liofilizador. Os tegumentos liofilizados foram triturados em multiprocessador, sendo pesados 200 mg da farinha obtida de cada amostra, os quais foram colocados em tubos apropriados para centrífuga e

adicionados 5ml de metanol. Os tubos foram agitados em agitador a 100 rpm, por 20 minutos, a 30⁰C e, em seguida, centrifugados a 17200 x g por 15 minutos. Foram pipetados 200 µl do sobrenadante de cada tubo e transferidos para quatro tubos Eppendorf. Ao primeiro dos quatro tubos contendo o cultivar de grãos vermelhos, acrescentou-se 1 ml de HCl 4% para leitura do branco, agitou-se em Vortex por alguns segundos e colocou-se em banho-maria a 30⁰ C. Após 3 minutos, adicionou-se ao 2^o , 3^o e 4^o tubos (repetições) 1 ml de Vanilina-HCl, agitou-se em Vortex por alguns segundos e colocou-se em banho-maria a 30⁰ C. Este procedimento foi repetido, a cada 3 minutos, com os cultivares branco e tipo carioca. Decorridos 20 minutos, após o início deste procedimento, iniciou-se a leitura em espectrofotômetro Beckman DU-60 a 500 nm, respeitando-se o mesmo intervalo de 3 minutos da ordem de colocação dos tubos em banho-maria.

Os cálculos para determinação do conteúdo de taninos foram efetuados como para a microanálise.

Análise de toda a semente

Quatro amostras de 30 sementes de cada cultivar foram trituradas em multiprocessador. Da farinha obtida, pesou-se 200 mg que foram colocados em tubos apropriados para ultracentrífuga e adicionados 5 ml de metanol. Os tubos foram agitados em agitador 100 rpm, por 20 minutos, a 30⁰ C e, em seguida, centrifugados a 17200 x g por 15 minutos. Foram pipetados 200 µl do sobrenadante de cada tubo e transferidos para tubos Eppendorf. No primeiro dos quatro tubos do cultivar vermelho, acrescentou-se 1 ml de HCl 4% para leitura do branco, agitou-se em Vortex por alguns segundos e colocou-se em banho-maria a 30⁰ C. Após 3 minutos, adicionou-se ao 2^o, 3^o e 4^o tubos (repetições) 1ml de Vanilina-Hcl, agitou-se em Vortex por alguns segundos e colocou-se em banho-maria a 30⁰ C. Este procedimento foi repetido, a cada 3 minutos, com os outros cultivares. Decorridos 20 minutos após o início deste procedimento, iniciou-se a leitura em espectrofotômetro Beckman DU-60 a 500 nm, respeitando-se o mesmo intervalo de 3 minutos da ordem de colocação dos tubos em banho-maria.

Os cálculos para determinação do conteúdo de taninos foram efetuados, como para a microanálise.

Procedeu-se a análise de variância dos dados, adotando-se o delineamento inteiramente ao acaso no esquema fatorial (3 procedimentos, 3 genótipos, 3 repetições) e comparação das médias pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, é representada a análise de variância dos dados obtidos na determinação do conteúdo de taninos na semente de feijão, empregando-se três procedimentos distintos para obtenção da amostra.

Tabela 1 - Resultados da análise de variância dos valores obtidos na determinação do conteúdo de taninos em sementes de três cultivares de feijão, utilizando três procedimentos de obtenção da amostra

FV	GL	QM
Cultivares (C)	2	1560,9660**
Procedimentos (P)	2	306,8443**
CxP	4	82,8542**
Resíduo	18	3,5797

** significativo a 1% de probabilidade.

$\bar{M} = 13,2482$

CV (%) = 14,2813

Tabela 2 - Conteúdo médio de taninos (gcat/100g de amostra), em sementes de três cultivares, utilizando-se três procedimentos de preparo da amostra (Tukey 0,05)

Tipo de grão	Procedimentos		
	1 (parte do tegumento)	2 (todo tegumento)	3 (semente inteira)
Vermelho	16,3909bA	31,4567aA	31,184aA
Carioca	3,4577cB	21,3873aB	15,340bB
Branco	1,5702aB	0,0132aC	0,0167aC

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si.

O procedimento 1 (parte do tegumento) não apresentou diferença para os cultivares de feijão tipo carioca e branco (Tabela 2). Os procedimentos 2 e 3, entretanto, apresentaram diferenças para os três cultivares, sendo detectado um conteúdo maior de taninos em todos eles (Tabela 2). Pode-se inferir, então, que o

procedimento de preparo 1 (parte do tegumento) não possibilita detectar diferenças de conteúdo de taninos, entre cultivares de sementes com médio e baixo conteúdo de taninos. Já os procedimentos 2 (todo tegumento) e 3 (toda semente) permitiram classificar as variedades em conteúdos diferentes de taninos pela proporção presente nas amostras (alto, médio, baixo).

Para o procedimento 3, com a semente inteira triturada, os valores encontrados para o conteúdo de taninos foram multiplicados por um fator de correção igual a 10, para as três variedades. Isto pode ser explicado em razão da proporção de tegumento que está sendo analisada na amostra, ser muito menor em relação ao volume total da mesma. Este procedimento utiliza toda semente triturada. Como a maior quantidade de taninos encontra-se no tegumento, a farinha tem proporcionalmente maior quantidade de endosperma do que de tegumento. Isto foi constatado por Guzmán-Maldonado et al. (1996), quando determinaram o conteúdo de taninos de 19 variedades de feijão-comum de diferentes cores, utilizando a metodologia de Price et al. (1978), usando todo o tegumento triturado e toda semente triturada. Esses autores sugeriram que taninos deviam ser determinados utilizando-se a farinha do tegumento, para que não houvesse uma subestimação dos valores, o que poderia invalidar os resultados obtidos.

Para chegar ao valor que foi adotado para o fator de correção, foram pesadas, separadamente, 10 sementes de cada cultivar (vermelho, carioca e branco). Em seguida, os tegumentos das sementes foram retirados com uma lâmina, depois, pesados. Conhecendo-se o peso de cada semente e de seu tegumento, foi possível calcular a percentagem média de peso do tegumento em relação à semente inteira, para cada uma das três variedades, chegando-se ao fator igual a 10 (dez). Salienta-se que, dependendo do tamanho das sementes de outros cultivares, o fator de correção pode ser diferente de 10.

Não existe uma escala para classificar os valores obtidos na determinação de taninos em alto, médio ou baixo. Entretanto, foi possível realizar esta classificação comparando-se os resultados obtidos dos cultivares.

Os procedimentos de preparo 1 e 3, para o feijão branco, e 2 e 3 para o vermelho proporcionaram a obtenção de resultados, estatisticamente, semelhantes. O feijão tipo carioca diferiu em relação aos três procedimentos. Uma provável explicação é que podem ocorrer variações dos cultivares submetidos aos diferentes procedimentos, ou em mais de uma análise, utilizando o mesmo procedimento, devido à grande variação no conteúdo de taninos em grãos individuais, como constataram Price et al. (1978). Além disso, dentro de um mesmo tipo de feijão, as sementes das várias linhagens podem apresentar diferenças quanto ao conteúdo de taninos devido a variações na cor (Deshpande & Cheryan, 1985).

Os métodos e tratamentos da amostra têm influência nos valores obtidos na análise entre e dentro dos métodos. Deste modo, uma comparação quantitativa de conteúdo de taninos é difícil, se não impossível. De acordo com Earp et al. (1981), o que se obtém, nestes testes, é uma medida relativa do conteúdo de taninos.

Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que os valores encontrados na determinação do conteúdo de taninos, utilizando como amostra, a semente inteira triturada, são subestimados se não forem multiplicados pelo fator de correção, que deve ser estabelecido para as variedades analisadas.

Os valores determinados com todo o tegumento da amostra liofilizado e triturado são mais precisos, independentemente de um fator de correção.

A microanálise é um procedimento que classifica variedades quanto ao conteúdo de taninos, mas, eventualmente, pode ser utilizada para constatação da presença ou não dos mesmos, quando as sementes não puderem ser destruídas.

4. CONCLUSÕES

Apesar dos vários fatores que interferem na determinação do conteúdo de taninos, pode se concluir para o procedimento de preparo da amostra, usando a metodologia de Price et al. (1978) que:

- ◆ A análise de todo o tegumento da amostra liofilizado e triturado é eficiente para determinação do conteúdo de taninos e para classificação das variedades, apresentando valores mais precisos.
- ◆ A utilização da semente inteira triturada separa variedades distintas quanto ao conteúdo de taninos, porém seus valores são subestimados, sendo necessário corrigi-los.
- ◆ A microanálise (parte do tegumento) pode ser utilizada, como um procedimento não-destrutivo para constatação da presença ou ausência de taninos sem consideração de seus valores quantitativos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. **J. Food Sci.**, v.50, n.4, p.905-910, 1985.
- DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M. Microstructure and water uptake of *Phaseolus* and winged beans. **J. Food Sci.**, v.51, n.5, p.1218-1223, 1985.
- DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.24, n.4, p.401-449, 1986.
- DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. Interactions of tannic acid and catechin with legume starches. **J. Food Sci.**, v.47, n.6, p.2080-2081, 1985.
- DESHPANDE, S.S.; SATHE, S.K.; SALUNKE, D.K.; CORNFORTH, D.F. Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols, and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Food Sci.**, v.47, n.6, p. 1846-1850, 1982.
- EARP, C.F.; AKINGBALA, J.O.; RING, S.H. and ROONEY, L.W. Evaluation of several methods to determine tannins in sorghums with varying kernel characteristics. **Cereal Chemistry**, v.58, n.3, p.234-238, 1981.
- GUZMÁN-MALDONADO, H.; CASTELLANOS, J.; GONZÁLES DE MEJÍA, R. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v.55, n.4, p.333-335, 1996.
- LEUNG, J.; FENTON, T.W.; MUELLER, M.M.; CLANDININJ, D.R. Condensed tannins of rapeseed meal. **J. Food Sci.**, v.44, n.5, p.1313-1316 , 1979.
- PRICE, M.L.; AN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.**v.26, n.5, p.1214-1218, 1978.
- REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Dry bean tannins: a review of nutritional implications. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.62, n.3, p.541-549, 1985.
- SALUNKHE, D.K.; JADHAV, S.J.; KADAM, S. S.; CHAVEN, J.K. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereal and legumes. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.17, n.3, p.277-305, 1982.
- SARKAR, S. K.; HOWART, R.E. Specificity the vanillin test for flavonols. **J. Agric. Food Chem.**, v.24, n.2, p.317-320, 1976.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Conteúdo de taninos da população de famílias F₄ (gcat/100g amostra)

Famílias	Bloco I	Bloco II
1	0	0
2	0,0010	0,1012
3	0,1289	0,0274
4	0	0,0050
6	0	0
7	0	0
8	2,8145	2,1110
9	0	0
10	0,004	1,4076
11	0	0
12	3,4317	3,6553
13	0,003	1,3460
15	0,5471	0,7468
16	0	0
17	0	0,0030
18	2,2061	1,7449
19	1,3535	0,6953
21	1,8776	3,1955
22	0,3140	0,0030
23	0	0
24	3,5153	3,0192
29	0,0060	0,0050
30	0	0
34	3,2331	2,0681
36	0,0010	0,0040
37	1,9764	2,3932
38	0,7194	0,3420
39	0,1178	0,4879
40	2,0664	0,9809
41	0	0
42	0,1326	0
44	0	0,0040
45	2,2955	1,3338
47	0,2917	1,2222
49	0	0,4828
51	2,1953	1,6807
52	0	0,2588
53	0,5532	0
54	1,6269	2,1239
55	0	0
56	0	0
57	0,0040	0,0030

Continuação Apêndice.....

60	0	0,0040
61	0	0
62	1,1741	0,0020
63	2,1520	0,7271
64	1,4086	0,1282
65	0	0
66	0,4957	0,4889
67	2,0759	1,8708
68	0,8926	0,0010
69	0,1570	0,0040
71	1,2272	0,4690
72	0,1489	0
73	0	0
74	0	0
75	0	0
76	1,0154	1,0239
78	0	0
79	0,1083	0,1452
80	1,8008	0,6412
81	2,6196	2,8741
82	1,3057	0,3255
83	0,1171	0,0281
84	0	0,8287
85	1,3568	1,0574
88	0	0,1959
90	0	0
92	0,4524	0,4610
93	0	0
94	0	0
95	0,1543	0
96	1,6066	1,3139
98	0	0,3488
99	0,2697	0,0040
100	0,0030	0,0020
101	0	0
102	0,2318	0,3526
103	0	0
104	0,5397	0,7549
105	0,3160	0,1411
106	0,0010	0,0020
107	0	0
109	0	0
110	0,5898	0,3604
111	0	0
112	0	0
113	0	0
114	0,7474	0,7282
115	0,5505	0,2906
117	0	0
118	0	0
119	1,4715	1,3007

Continuação Apêndice.....

120	0,1218	0
121	0	0,7975
122	2,7116	3,3701
123	0,0030	0,3918
125	1,9632	1,9950
126	0,0020	0,0020
127	0	0,1952
128	0	0
129	0	0
130	0,0020	0,0010
131	0,3925	0,6936
132	0,0010	0,2253
133	0,0040	0,0010
134	0,0030	0,0030
135	0,1455	0,2206
136	0,0020	0
137	0	0
138	0	0
140	0	1,1866
141	0	0
142	0,1560	0,0030
143	0	0
144	0,8033	0,6148
147	0,2528	0,2878
149	0	0,2524
150	1,0851	0,1590
152	0	0
153	0	0,7430
155	0,3898	1,5108
156	0	0,5600
157	0,6107	1,1782
158	0	0
159	0	0
160	0	0
161	0,0040	0
163	0	0
164	0	0
165	0	0
167	0,9440	2,2061
168	1,2557	2,3966
169	0	0