

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Influência do processamento e do processo digestivo *in vitro* na
bioacessibilidade de compostos fenólicos do feijão comum**

Samara dos Santos Harada Padermo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2017**

**Samara dos Santos Harada Padermo
Engenheira de Alimentos**

**Influência do processamento e do processo digestivo *in vitro* na
bioacessibilidade de compostos fenólicos do feijão comum**

Orientadora:
Profa. Dra. **SOLANGE GUIDOLLIN CANNIATTI BRAZACA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Harada Padermo, Samara dos Santos

Influência do processamento e do processo digestivo *in vitro* na bioacessibilidade de compostos fenólicos do feijão comum / Samara dos Santos Harada Padermo. - - Piracicaba, 2017.

84 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

1. Leguminosas 2. Compostos bioativos 3. Polifenóis 4. Biodisponibilidade 5. Tratamento térmico 6. Cocção 7. Antioxidantes. I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao meu esposo, por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter concedido muitas bênçãos em minha vida e por sempre se mostrar presente em meus caminhos. Sustentando-me em seus braços fortes nos momentos difíceis e me dando paciência e força para continuar lutando todos os dias para alcançar meus objetivos.

Ao meu esposo Jesiel, obrigada pelo companheirismo, amor, paciência e dedicação de todos os dias. Obrigada pelos momentos de descontração, você tem me feito muito feliz. Desculpe pelos dias que estava cansada demais para te dar atenção ou ocupada com as coisas da faculdade, sei que você não me julgou por isso, pelo contrário, sempre demonstrou seu apoio e compreensão. Eu te amo!

Aos meus pais Gilberto e Silmara por terem me dado amor, me educado e sempre me incentivado a estudar. Mesmo me acompanhando de longe me deram forças para prosseguir, vocês também tem parte nesta vitória. Ao meu irmão Érik pela amizade, por me ouvir quando precisei e por ter me dado apoio quando escolhi ingressar no mestrado, obrigada!

À minha orientadora profa. Dra. Solange Brazaca, por ter me recebido bem desde o primeiro momento, quando ainda não conhecia nada, nem ninguém na Esalq, isso foi muito importante pra mim. Agradeço também pela sua paciência e dedicação.

Ao prof. Dr. Carlos Tadeu e ao Érick Saldaña pelo auxílio no delineamento experimental e nas análises estatísticas.

Às minhas amigas de longe, que de forma alguma são menos importantes, Liara, Carolina, Yara e Tatiane, obrigada pelos bons momentos que compartilhamos, pelas conversas, conselhos e risadas, vocês tem lugar garantido no meu coração.

Aos meus amigos da Esalq, por terem tornado os dias de estudo mais alegres, por terem compartilhado comigo seus conhecimentos, enriquecendo a cada dia meu convívio social e meu aprendizado. Ao pessoal do laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição, pelos bons momentos. Em especial, ao Rafael e ao Marcelo pela ajuda com as análises e por sempre estarem dispostos a ajudar, ah também a Marion e Clara, nossas estagiárias francesas pelo auxílio no laboratório. A você Nataly, meu imenso agradecimento, pelo auxílio no laboratório, mas principalmente pela amizade sincera, que trouxe leveza a momentos difíceis, pelos bons conselhos, boas risadas e por me apresentar algumas das delícias de Piracicaba, obrigada!

Aos docentes da Escola Superior Agricultura “Luiz de Queiroz” e do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) pela oportunidade de aprendizado que levarei sempre comigo. Aos técnicos de laboratório que me auxiliaram nas análises deste projeto. Aos secretários do LAN por sempre se mostrarem solícitos quando precisei.

Agradeço também à banca examinadora pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Agradeço à Embrapa Arroz e Feijão pela doação das amostras utilizadas neste trabalho.

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

Enfim a todos aqueles que tornaram meus dias mais alegres, mais leves, mais coloridos, que estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma forma com o meu trabalho e com o meu crescimento profissional, meu sincero agradecimento!

EPÍGRAFE

A maior recompensa pelo esforço de uma pessoa não é o que ela ganha com isso,
mas o que ela se torna através dele.

John Ruskin

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. FEIJÃO	19
2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS	20
2.2.1. Compostos fenólicos em leguminosas	23
2.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	24
2.3.1. Potencial antioxidante das leguminosas	26
2.4. BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE	27
2.4.1. Fatores que afetam a bioacessibilidade de polifenóis.....	28
2.4.2. Métodos para avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos <i>in vitro</i>	30
REFERÊNCIAS	31
3. TRATAMENTO TÉRMICO POSSIBILITA AUMENTO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FEIJÃO COMUM.....	39
RESUMO	39
ABSTRACT	39
3.1. INTRODUÇÃO	39
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.2.1. Material	41
3.2.2. Tratamentos.....	41
3.2.3. Preparo de amostra.....	41
3.2.4. Métodos	42
3.2.4.1. Extração dos compostos fenólicos	42
3.2.4.2. Determinação da matéria seca	42
3.2.4.3. Análise de compostos fenólicos totais (FT)	42
3.2.4.4. Atividade antioxidante.....	42
3.2.4.5. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	42
3.2.4.6. DPPH (1,1 difenil – 2 – picrilidrazil)	43
3.2.4.7. ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico).....	43
3.2.4.8. Análise estatística.....	43
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.3.1. Conteúdo de fenólicos totais	44
3.3.2. Atividade antioxidante	46
3.4. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	50
4. BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO FEIJÃO COMUM: INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E DO PROCESSO DE DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	55
RESUMO	55
ABSTRACT	55
4.1. INTRODUÇÃO	55
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.2.1. Material	57
4.2.2. Tratamentos e preparo de amostra	57
4.2.3. Extração dos compostos fenólicos	58
4.2.4. Determinação da matéria seca.....	58
4.2.5. Análise de compostos fenólicos por CLAE	58
4.2.6. Análise de compostos fenólicos totais (FT).....	59
4.2.7. Digestão <i>in vitro</i>	59
4.2.8. Análise estatística.....	61
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.3.1. Efeito da forma de processamento sobre os compostos fenólicos	62

4.3.2. Influência da digestão <i>in vitro</i> e do processamento sobre a bioacessibilidade dos compostos fenólicos	67
4.4. CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
ANEXOS	84

RESUMO

Influência do processamento e do processo digestivo *in vitro* na bioacessibilidade de compostos fenólicos do feijão comum

O feijão tem destaque por ser base da alimentação brasileira juntamente com o arroz, fornecendo nutrientes essenciais ao desenvolvimento humano, como proteínas e minerais. Os benefícios do consumo de feijão vão além do fornecimento de nutrientes essenciais, já que esta leguminosa tem se destacado também por seu potencial benéfico à saúde, apresentando efeito antioxidante e antimutagênico. Estes efeitos têm sido associados à presença de compostos bioativos, em especial os compostos fenólicos. O processamento térmico é essencial para o consumo destes grãos, entretanto, pode causar modificações nos seus fitoquímicos, seja na composição ou na concentração. Além disso, é preciso ressaltar que nem todo conteúdo de polifenóis, ou de qualquer nutriente, é absorvido e aproveitado integralmente pelo organismo, é preciso compreender como o processo digestivo influencia a bioacessibilidade destes compostos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes formas de tratamento térmico sobre os principais compostos fenólicos (mais relevantes de acordo com a literatura), conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos feijões carioca e preto (variedades mais consumidas no Brasil), além de verificar a influência do tratamento térmico e do processo digestivo simulado *in vitro* sobre a concentração e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos encontrados nas amostras. Foram avaliados grãos crus; grãos macerados em água por 12 horas; grãos cozidos em panela aberta com ou sem a água de maceração; grãos cozidos sob pressão com ou sem a água de maceração. Foram realizadas análises de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e ORAC, além da análise cromatográfica dos principais compostos fenólicos dos feijões. As amostras cozidas foram submetidas à digestão *in vitro* e analisadas quanto ao seu conteúdo de compostos fenólicos. O tratamento térmico promoveu a liberação de compostos fenólicos ligados a matriz, aumentando assim, o conteúdo de polifenóis livres acompanhado do aumento do potencial antioxidante em relação ao grão cru. A utilização da água de maceração e de pressão durante a cocção preservou maior conteúdo de polifenóis em relação aos tratamentos onde a água foi descartada e aos tratamentos em panela aberta. A avaliação da bioacessibilidade permitiu verificar que o processo digestivo tem influência na concentração dos polifenóis, sendo que a etapa duodenal, em especial, foi marcada por redução na concentração dos compostos fenólicos analisados. As amostras em que a água de maceração foi utilizada na cocção tinham maior conteúdo de polifenóis livres, entretanto, este conteúdo não estava totalmente bioacessível. Sendo assim, o descarte da água de maceração e a utilização de pressão para cocção são os procedimentos mais indicados para preservação dos compostos fenólicos da fração bioacessível. Neste estudo foi evidenciado que o tratamento térmico, a matriz e o processo digestivo *in vitro* têm influência sobre os compostos fenólicos da fração bioacessível.

Palavras-chave: Leguminosas; Compostos bioativos; Polifenóis; Biodisponibilidade; Tratamento térmico; Cocção; Antioxidantes

ABSTRACT

Influence of processing and *in vitro* digestive process on the bioaccessibility of phenolic compounds of common beans

Beans are highlighted as being the basis of the Brazilian diet along with rice, providing essential nutrients for human development, such as proteins and minerals. The benefits of bean consumption go beyond the supply of essential nutrients, since this legume has also been highlighted by its beneficial potential to health, showing antioxidant and antimutagenic effect. These effects have been associated with the presence of bioactive compounds, especially the phenolic compounds. Thermal processing is essential for the consumption of these grains, however, it can cause changes in their phytochemicals, either in composition or in concentration. In addition, it should be noted that not all polyphenol content, or any nutrient, is fully absorbed and utilized by the body, so it is necessary to understand how the digestive process influences the bioaccessibility of these compounds. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of different forms of thermal treatment on the main phenolic compounds (more relevant according to the literature), total phenolic content and antioxidant activity of the carioca and black beans (most consumed varieties in Brazil), in addition to verifying the influence of the heat treatment and simulated *in vitro* digestive process on the concentration and bioaccessibility of the phenolic compounds found in the samples. Raw grains; grains macerated in water for 12 hours; grains cooked in an open pan with or without soaking water; grains cooked under pressure with or without soaking water were evaluated. Analyses of the total phenolic compounds, antioxidant activity by the DPPH, ABTS and ORAC methods, as well as the chromatographic analysis of the main phenolic compounds of the beans were performed. Cooked samples were submitted to *in vitro* digestion and analyzed for their content of phenolic compounds. The heat treatment promoted the release of phenolic compounds bound to the matrix, thus increasing the content of free polyphenols accompanied by the increase of the antioxidant potential in relation to the raw grain. The use of the soaking water and pressure during cooking preserved a higher content of polyphenols than the treatments in which the water was discarded and the treatments cooked in an open pan. The evaluation of the bioaccessibility allowed to verify that the digestive process has influence in the concentration of the polyphenols, and that the duodenal stage, in particular, was marked by reduction in the concentration of the phenolic compounds analyzed. The samples in which the soaking water was used in the cooking process had higher content of free polyphenols, however, this content was not totally bioaccessible. Therefore, the discard of the soaking water and the use of cooking pressure are the most suitable procedures for the preservation of the phenolic compounds of the bioaccessible fraction. In this study it was evidenced that the thermal treatment, the matrix and the *in vitro* digestive process have influence on the phenolic compounds of the bioaccessible fraction.

Keywords: Legumes; Bioactive compounds; Polyphenols; Bioavailability; Heat treatment; Cooking; Antioxidants

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas são amplamente consumidas em todo o mundo. Estes grãos têm papel importante na dieta de seus consumidores, principalmente por serem fontes de proteína de baixo custo (HAYAT et al., 2014). No Brasil, a leguminosa mais consumida pela população é o feijão. Este grão, juntamente com o arroz, constitui a base alimentação brasileira e está presente na mesa das mais diversas classes sociais. Seu consumo per capita é elevado, e pesquisas revelam que, entre os anos de 2008 e 2010, os brasileiros consumiram, em média, 17 kg/ano de feijão (WANDER e CHAVES, 2011).

Alimento rico do ponto de vista nutricional, o feijão é constituído por 50-70 % de carboidratos, 20 – 30 % de proteínas, 1 – 2,5% de lipídeos (HAYAT et al., 2014). Além disso, é rico em vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina K, vitamina B₆) (AFONSO, 2010) e minerais (ferro, zinco, manganês, cobre, magnésio, cálcio, potássio e fósforo) (MESQUITA et al., 2007). Além dos nutrientes essenciais, o feijão apresenta compostos bioativos, os quais têm recebido grande atenção nos últimos anos devido aos seus efeitos potenciais sobre a saúde, atuando como antioxidantes e também como anticarcinogênicos (CARDADOR-MARTÍNEZ et al., 2006; ZHAO et al., 2014).

Os bioativos de maior relevância em feijões são os compostos fenólicos (LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006; LIN et al., 2008; MOJICA et al., 2015), metabólitos secundários das plantas, relacionados com o sistema de defesa das mesmas, contra processos infecciosos, altas temperaturas e exposição à radiação UV (MANACH et al., 2004; CARRATU e SANZINI, 2005; HORST e LAJOLO, 2009).

Nos alimentos, o conteúdo fenólico é bastante variado, pois cada espécie possui uma necessidade específica quanto à produção de fitoquímicos, e isso está diretamente relacionado à informação genética de cada planta. É importante ressaltar que a distribuição dos polifenóis nos alimentos não é uniforme, visto que, em alguns deles, as maiores quantidades de polifenóis são encontradas nas cascas e sementes se comparados aos teores verificados nas partes comestíveis (VAN DER SLUIS et al., 2001; MOURE et al., 2001). Fatores ambientais como o clima, exposição à radiação solar, técnicas de cultivo, época da colheita também influenciam na distribuição e na quantidade de polifenóis presente nos alimentos (VAN DER SLUIS et al., 2001; DUPONT et al., 2000).

Levando em consideração estes fatos, pode-se afirmar que o conteúdo de polifenóis nas diferentes variedades de feijão é bastante diversificado. Lin et al. (2008) avaliaram o perfil fenólico de 10 variedades de feijão comum, e os resultados indicaram a presença de antocianinas apenas nas variedades de feijão preto e vermelho, ácidos hidroxicinâmicos em todas as variedades de feijão avaliadas e flavonoides nas variedades coloridas (preto e vermelho).

De acordo com alguns estudos dedicados a investigar o perfil fenólico de diferentes variedades de feijão, as principais classes fenólicas encontradas nestes alimentos são: flavonoides, que englobam as antocianinas (delfinidina, malvidina, petunidina e suas formas glicosiladas) e também os flavonóis (campferol, epicatequina, quercetina, catequina e suas formas glicosiladas). Outra classe são as dos ácidos fenólicos (p-cumárico, gálico, ferúlico, cafeico, sinápico, entre outros)

e proantocianidinas (LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006; LIN et al., 2008; XU e CHANG, 2009; MOJICA et al., 2015).

O tratamento térmico dos alimentos, fundamental em nosso dia a dia, proporciona melhoria das características sensoriais dos alimentos, melhorando assim a palatabilidade dos mesmos e também a digestibilidade de proteínas e amidos, além de reduzir os fatores antinutricionais. Contudo, a cocção também pode causar modificações nos fitoquímicos presentes nas leguminosas. Xu e Chang (2009) avaliaram a influência do tratamento térmico sobre os compostos fenólicos e as propriedades antioxidantes dos feijões preto e marrom e puderam verificar que, tanto o cozimento em água, quanto o cozimento em vapor, causaram redução do conteúdo fenólico nas duas variedades de feijão, reduzindo conseqüentemente o potencial antioxidante. Entre os processamentos avaliados por estes autores, o cozimento com vapor proporcionou melhor manutenção do conteúdo fenólico das amostras de feijão. Já em outro trabalho, realizado por Ranilla, Genovese e Lajolo (2009), com feijões brasileiros (preto e jalo), foi demonstrado que o tratamento térmico possibilitou aumento na quantidade total de polifenóis detectada nas amostras e, segundo os autores, isso se deve a hidrólise dos ácidos fenólicos conjugados, resultando na liberação de ácidos fenólicos livres. Estes autores inferiram que os fatores que mais influenciaram a composição fenólica dos feijões cozidos foram a maceração e a drenagem da água de cocção.

Estudos recentes têm demonstrado que os compostos fenólicos encontrados em feijão apresentam efeitos benéficos à saúde, devido a sua atividade antioxidante (PALOMBINI et al., 2013; ZHAO et al., 2014; MOJICA et al., 2015), anti-inflamatória (GARCIA-LAFUENTE et al., 2014; MORENO-JIMENEZ et al., 2015), e também potencial para inibir enzimas relacionadas à absorção de glicose (MOJICA et al., 2015). Porém, deve-se ter cautela quando se relaciona os efeitos benéficos à saúde com os compostos presentes na matriz alimentar, já que a quantidade de polifenóis ingerida não reflete necessariamente a quantidade utilizada pelo organismo. Por isso, é importante conhecer a bioacessibilidade e a biodisponibilidade das substâncias bioativas (MANACH et al., 2004).

A biodisponibilidade pode ser definida como a quantidade do nutriente ingerido que é absorvida pelo intestino e se torna disponível para ser utilizada no local de ação (PARADA e AGUILERA, 2007; JACOB et al., 2012). Sendo assim, o termo biodisponibilidade envolve digestão gastrointestinal, absorção, metabolismo, distribuição nos tecidos e bioatividade (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009). Diretamente relacionada ao estudo da biodisponibilidade de nutrientes está a avaliação da bioacessibilidade, definida como a fração ou quantidade do composto de interesse que é liberada da matriz alimentar durante a digestão gastrointestinal e torna-se disponível para absorção no intestino (PARADA e AGUILERA, 2007; JACOB et al., 2012; CARBONELL-CAPELA et al., 2014).

Desta maneira, a biodisponibilidade dos fitoquímicos, em especial dos compostos fenólicos, é dependente da estabilidade ao processo digestivo, da sua liberação da matriz alimentar, da eficiência no transporte transepitelial e de diversos fatores fisiológicos. Sendo assim, a bioacessibilidade compõe etapa importante no estudo da biodisponibilidade dos polifenóis (RUBIÓ et al., 2014).

Os estudos de bioacessibilidade, geralmente são conduzidos *in vitro* (CARBONELL-CAPELA et al., 2014), são úteis para avaliar possíveis interações entre os nutrientes e o composto de interesse, bem como, o efeito do processamento, cultivar, condições de cultivo sobre a matriz do alimento e seu impacto sobre a bioacessibilidade do analito de interesse. (ETCHEVERRY, GRUSAK E FLEIGE, 2012). Na literatura, existe uma diversidade de métodos *in vitro* utilizados para simular o processo de digestão na avaliação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos. O método *in vitro* mais conhecido de simulação do processo digestivo foi desenvolvido por Gil-Izquierdo, Zafrilla e Tomás-Barberan (2002). Os trabalhos posteriores a este realizaram modificações para adaptar a metodologia a uma nova matriz alimentar ou ainda para enriquecer esta metodologia.

O interesse pela avaliação da bioacessibilidade de compostos bioativos vem aumentando nos últimos anos. Em termos de bioacessibilidade de compostos fenólicos, a maior parte das pesquisas dedica-se a estudar bioacessibilidade de polifenóis presentes em frutas e vegetais (ANDRE et al., 2015; BOUAYED et al., 2012; CORREA-BETANZO et al., 2014; KAMILOGLU et al., 2015; TENORE et al., 2013). Em virtude do elevado consumo de feijão, estudos desenvolvidos na última década têm investigado a bioacessibilidade de polifenóis encontrados em feijões cozidos (CHEN et al., 2015; LAPARRA; GLAHN; MILLER, 2008; NDERITU et al., 2013) ou em extratos de feijão (CHIANG et al., 2014; SANCHO; PAVAN; PASTORE, 2015). Porém, ainda há poucos estudos que avaliaram a influência da forma de processamento sobre a bioacessibilidade de compostos fenólicos do feijão (AKILLIOGLU e KARAKAYA, 2010; LUO et al., 2014).

Até o momento, não foram encontrados trabalhos sobre avaliação da influência da forma de processamento e do processo digestivo na bioacessibilidade de compostos fenólicos presentes em feijões carioca e preto, consumidos no Brasil.

Sendo assim, frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a influência do processamento sobre o conteúdo de compostos fenólicos e sobre a atividade antioxidante dos feijões carioca e preto, bem como, analisar os principais compostos fenólicos (mais relevantes de acordo com a literatura) verificando a influência da forma de processamento e do processo digestivo simulado *in vitro* sobre a concentração e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes nestes feijões.

Referências

- AFONSO, S. M. E. **Caracterização Físico-Química e Atividade Antioxidante de Novas Variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*)**. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico, Bragança, 2010.
- AKILLIOGLU, H. G.; KARAKAYA, S. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and *in vitro* digestion process. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 3, p. 633–639, 2010.
- ANDRE, C. M.; EVERS, D.; ZIEBEL, J.; GUIGNARD, C.; HAUSMAN, J.; BONIERBALE, M.; FELDE, T.; BURGOS, G. *In Vitro* Bioaccessibility and Bioavailability of Iron from Potatoes with Varying

- Vitamin C, Carotenoid, and Phenolic Concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 63, n. 41, p. 9012–9021, 2015.
- BOUAYED, J.; DEUBER, H.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. **Food Chemistry**, London, v. 131, n. 4, p. 1466–1472, 2012.
- CARBONELL-CAPELA, J. M.; BUNIOWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, Chicago, v. 13, p. 155-171, 2014.
- CARDADOR-MARTINEZ, A.; ALBORES, A.; BAH, M.; CALDERÓN-SALINAS, V.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.; SHIMADA-MIYASAKA, A.; LOARCA-PIÑA, G. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, p. 161-168, 2006.
- CARRATU, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Annali-Istituto Superiore Di Sanita**, Roma, v. 41, n. 1, p. 7, 2005.
- CHEN, P. X.; DUPUIS, J. H.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; LIU, R.; LIU, Q.; TANG, Y.; ZHANG, B.; RONG, T. Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of cooked regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 63, p. 10448–58, 2015.
- CHIANG, Y. C.; CHEN, C. L.; JENG, T. L.; LIN, T. C.; SUNG, J. M. Bioavailability of cranberry bean hydroalcoholic extract and its inhibitory effect against starch hydrolysis following *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, Barking, v. 64, p. 939–945, 2014.
- CORREA-BETANZO, J.; ALLEN-VERCOE, E.; MCDONALD, J.; SCHROETER, K.; CORREDIG, M.; PALIYATH, G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 522-531, 2014.
- DUPONT, M. S.; MONDIN, Z.; WILLIAMSON, G.; PRICE, K. R. Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 48, p. 3957-3964, 2000.
- ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 3:317, p. 1-22, 2012.
- FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, New York, v. 29, p. 751-760, 2009.
- GARCIA-LAFUENTE, A.; MORO, C.; MANCHÓN, N.; GONZALO-RUIZ, A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M.; MATEO-VIVARACHO, L. *In vitro* anti-inflammatory activity of

- phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food Chemistry**, London, v. 161, p. 216-223, 2014.
- GIL-IZQUIERDO, A.; ZAFRILLA, P.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 214, p. 155-159, 2002.
- HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 54, p. 580-592, 2014.
- HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. 2009. Disponível em: < <https://nutricaoclinicaeesteticafiles.wordpress.com/2011/07/biodisponibilidade-de-compostos-bioativos.pdf>>. Acesso em: 11 de maio de 2015.
- JACOB, J. K.; TIWARI, K.; CORREA-BETANZO, J.; MISRAN, A.; CHANDRASEKARAN, R.; PALIYATH, G. Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. **Annual Review Food Science Technology**, Palo Alto, v. 3, p. 79-104, 2012.
- KAMILOGLU, S.; PASLI, A. A.; OZCELIK, B.; CAMP, J.V.; CAPANOGLU, E. Influence of different processing and storage conditions on *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. **Food Chemistry**, London, v. 186, p. 74-82, 2015.
- LAPARRA, J. M.; GLAHN, R. P.; MILLER, D. D. Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* P.) and iron (Fe) availability to Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 10999-11005, 2008.
- LIN, L., HARNLY, J. M., PASTOR-CORRALES, M. S., LUTHRIA, D. L. The polyphenolic profiles of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 399-410, 2008.
- LUO, Y.; XIE, W.; HAO, Z.; JIN, X.; WANG, Q. The impact of processing on *in vitro* bioactive compounds bioavailability and antioxidant activities in faba bean (*Vicia faba* L.) and azuki bean (*Vigna angularis* L.). **International Food Research Journal**, Serdang, v. 21, n. 3, p. 995–1001, 2014.
- LUTHRIA, D. L.; PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, p. 205-211, 2006.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C. RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MESQUITA, F. R.; CORREA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.
- MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, Barking, v. 69, p. 38-48, 2015.

- MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; CERVANTES-CARDOZA, V.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZALEZ-LAREDO, R. F.; ESTRELLA, I.; GARCIA-GASCA, T. J.; HERRERA-CARRERA, E.; DIAZ-RIVAS, J. O.; ROCHA-GUZMAN, N. E. Phenolic composition changes of processed common beans: Their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. **Food Research International**, Barking, v. 76, n. P1, p. 79–85, 2015.
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, p. 145-171, 2001.
- NDERITU, A. M.; DYKES, L.; AWIKA, J. M.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 3, p. 1763–1771, 2013.
- PALOMBINI, S. V.; MARUYAMA, S. A.; CLAUS, T.; MONTANHER, P. F.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V.; GOMES, S. T. M.; MATSUSHITA, M. Antioxidant activity of Brazilian bean cultivars. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 765-770, 2013.
- PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 21-32, 2007.
- RANILLA, L. G.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5734-5742, 2009.
- RUBIÓ, L.; MACIÀ, A.; CASTELL-AUVÍ, A.; PINENT, M.; BLAY, M. T.; ARDÉVOL, A.; ROMERO, M.P.; MOTILVA, M. J. Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by *in vitro* digestion and cell models. **Food Chemistry**, London, v. 149, p. 277-284, 2014.
- SANCHO, R. A. S.; PAVAN, V. PASTORE, G. M. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. **Food Research International**, Barking, v. 76, p. 74-78, 2015.
- TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; RITIENI, A.; NOVELLINO, E. *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). **Food Chemistry**, London, v. 141, p. 3519-3524, 2013.
- VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; JAGER, A.; JONGEN, W. M. F. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3606-3613, 2001.
- WANDER, A.E.; CHAVES, M.O. Consumo per capita de feijão no Brasil de 1998 a 2010: Uma comparação entre consumo aparente e consumo domiciliar. In: 10º Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão (CONAFE), 2011, Goiânia. **Anais eletrônicos** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/916073/1/soceco5.pdf>>. Acesso em: 09 jun. 2015.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected

by Thermal Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 11, p. 4754-4764, 2009.

ZHAO, Y.; DU, S.; WANG, H.; CAI, M. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chemistry**, London, v. 152, p. 462-466, 2014.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Feijão

As leguminosas são amplamente consumidas em todo o mundo, em especial nos países em desenvolvimento. Entre as leguminosas, a que mais se destaca é o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (NYAU, 2014). No Brasil, o consumo de feijão é bastante elevado, já que este grão, juntamente com o arroz, compõe a base da alimentação brasileira. O consumo per capita de feijão chegou a 17 kg/ano entre 2008 e 2010, segundo Wander e Chaves (2011).

Entre as variedades mais consumidas no Brasil está o feijão carioca, aceito praticamente em todo o território nacional, sendo que esta cultivar ocupa cerca de 53% da área plantada de feijão no Brasil. O feijão preto é mais popular no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. Já na região Nordeste, o feijão mulatinho é o mais aceito, enquanto outras variedades, como os tipos roxo e rosinha, são mais populares nos estados de Minas Gerais e Goiás (EMBRAPA, 2003).

Segundo dados da Conab (2017), a safra nacional de feijão, entre os anos de 2015 e 2016, foi de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas. Já para o período de 2016/2017 a estimativa é de produzir até 3,12 milhões de toneladas, o que representa aumento de aproximadamente 24 % na produção, enquanto que a área plantada mantém-se praticamente inalterada. A produção dos feijões preto e carioca concentra-se na região Centro-Sul do Brasil, enquanto que o feijão caupi é cultivado em maior volume na região Norte/Nordeste, fato que provavelmente se relaciona às tendências de consumo destes tipos de feijão. O mapa da produção nacional de feijão (Figura 1) revela que o maior volume de produção de feijão está concentrado na região Centro-Sul do país.

Nutricionalmente, o feijão é considerado excelente fonte de nutrientes essenciais e também de micronutrientes. Este grão é conhecido por seu conteúdo proteico, o qual quando combinado com cereais, pode complementar o valor nutricional das proteínas. Entre os nutrientes encontrados no feijão destacam-se os carboidratos, presentes em maior proporção, representando de 50-70% da composição nutricional da leguminosa. Em seguida encontram-se as proteínas, que representam de 20-30 % do total. A porção lipídica dos feijões é bastante reduzida, representando de 1 – 2,5%, constituída principalmente de ácidos graxos insaturados (HAYAT, 2014). Além destes macronutrientes, o feijão é rico em vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina K, vitamina B₆, entre outras) (AFONSO, 2010) e minerais (ferro, zinco, manganês, cobre, magnésio, cálcio, fósforo e potássio) (MESQUITA et al., 2007).

Além dos macro e micronutrientes, o feijão tem recebido atenção nos últimos anos devido ao seu efeito benéfico sobre a saúde, atuando na prevenção e/ou redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, obesidade, diabetes *mellitus* e câncer (HAYAT, 2014; NYAU, 2014). Os fitoquímicos presentes no feijão, em especial os compostos fenólicos, têm sido correlacionados com estes efeitos benéficos, especialmente devido a atividade antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória e anticarcinogênica (CARDADOR-MARTÍNEZ et al., 2006; ZHAO et al., 2014; MORENO-JIMENEZ, 2015; MOJICA et al., 2015).

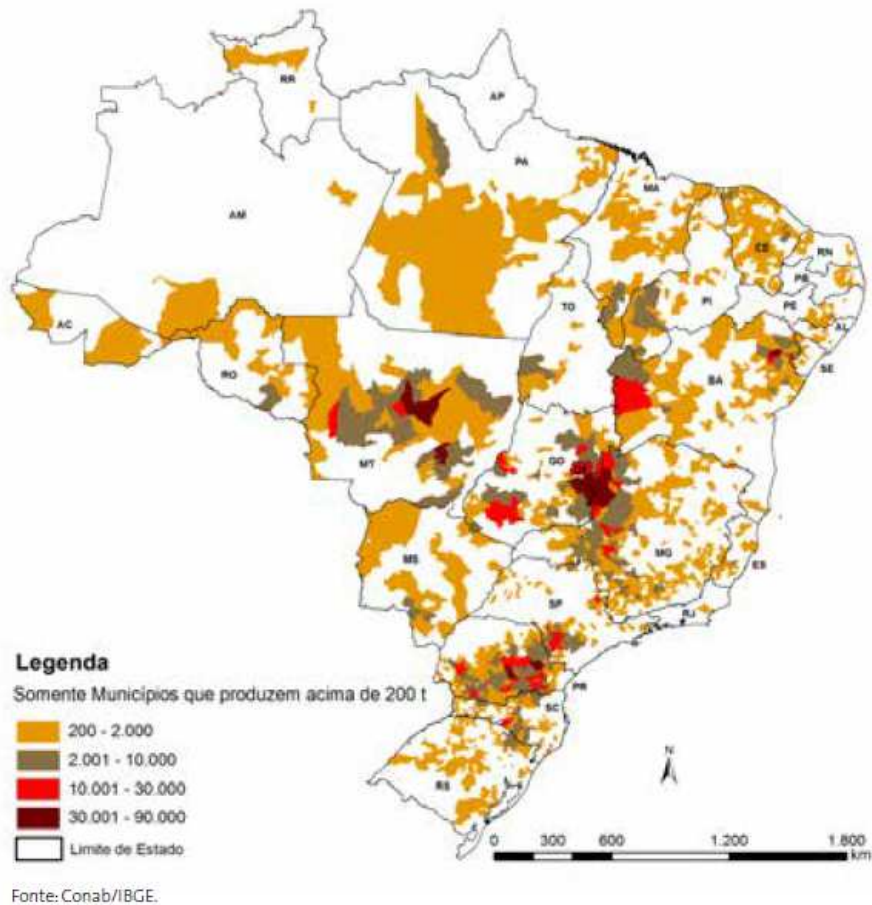


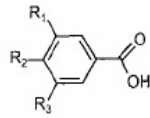
Figura 1. Mapa da produção nacional de feijão

2.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e estão envolvidos no sistema de defesa das mesmas contra situações de estresse, como exposição à radiação ultravioleta, altas temperaturas, agressão de patógenos e insetos. Estes compostos se relacionam também às características sensoriais e à pigmentação das plantas (MANACH et al., 2004; CARRATU e SANZINI, 2005; HORST e LAJOLO, 2009). A presença dessas substâncias tem sido estudada devido a suas propriedades farmacológicas, antinutricionais e antioxidantes (SOARES, 2002).

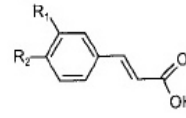
Os fenólicos podem ser classificados em diferentes grupos funcionais de acordo com o número de anéis aromáticos presentes na molécula e com os elementos estruturais aos quais estes anéis estão ligados. Os polifenóis são divididos em: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (Figura 2). Como se pode perceber, este grupo é bastante diversificado, ademais, os compostos fenólicos podem ainda ser encontrados ligados a vários carboidratos, ácidos orgânicos e a outros fenólicos (MANACH et al., 2004).

Hydroxybenzoic acids



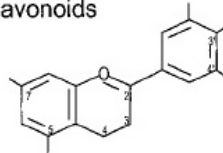
$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

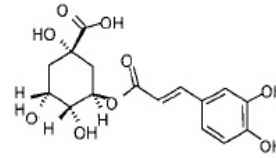


$R_1 = \text{OH}$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Caffeic acid
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Ferulic acid

Flavonoids

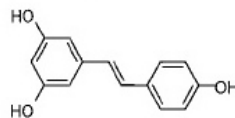


See Figure 2



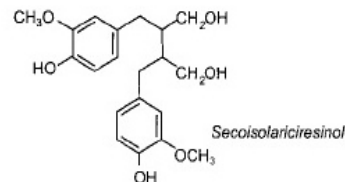
Chlorogenic acid

Stilbenes



Resveratrol

Lignans



Secoisolariciresinol

Figura 2. Estrutura química dos compostos fenólicos (MANACH et al., 2004)

Os ácidos fenólicos se caracterizam, de maneira geral, como fenóis que possuem um grupo ácido carboxílico funcional. Estes ácidos podem ser divididos em dois grupos distintos: os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 3) e os hidroxibenzoicos (Figura 4), os quais apresentam um esqueleto básico, porém o número e as posições dos grupos hidroxila no anel aromático estabelecem a diferença e a variedade entre os compostos (STALIKAS, 2007).

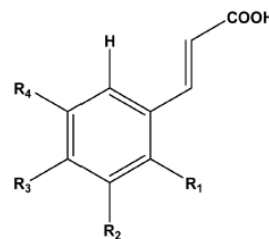


Figura 3. Estrutura básica dos ácidos hidroxicinâmicos (STALIKAS, 2007)

Tabela 1. Grupos de substituição dos principais ácidos hidroxicinâmicos

Nome	R1	R2	R3	R4
Ácido Cinâmico	H	H	H	H
Ácido o-Cumárico	OH	H	H	H
Ácido m-Cumárico	H	OH	H	H
Ácido p-Cumárico	H	H	OH	H
Ácido Ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido Sináptico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido Caféico	H	OH	OH	H

Fonte: STALIKAS, 2007

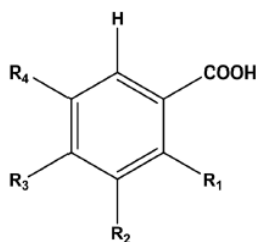


Figura 4. Estrutura básica dos ácidos hidroxibenzoicos (STALIKAS, 2007)

Tabela 2. Grupos de substituição dos principais ácidos hidroxibenzoicos

Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido Benzoico	H	H	H	H
Ácido p- hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido protocatecuico	H	OH	OH	H
Ácido siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido gentísico	OH	H	H	OH
Ácido verátrico	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Ácido salicílico	OH	H	H	H

Fonte: STALIKAS, 2007

O grupo dos flavonoides apresenta uma estrutura básica que consiste em dois anéis aromáticos A e B, ligados por uma ponte de três carbonos, geralmente na forma de anel aromático, como mostra a Figura 5. Variações na substituição do anel C resultam nas subclasses de flavonoides, já das substituições nos anéis A e B derivam os diferentes compostos em cada classe. As subclasses de flavonoides são os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavanonas, as antocianidinas e os flavanóis (MANACH et al., 2004; BALASUNDRAM, SUNDRAM E SAMMAN, 2006).

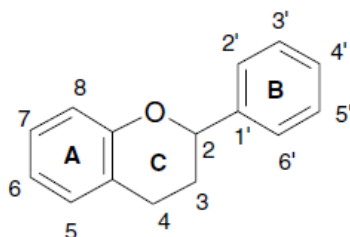


Figura 5. Estrutura química básica dos flavonoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006)

Estudos demonstram que os flavonóis contribuem significativamente com as defesas antioxidantes presentes no plasma sanguíneo. Além disso, a ingestão de flavonas e flavonóis foi associada com a prevenção de doenças cardiovasculares. (HOLLMAN e KATAN, 1999). Pesquisas

também apontam que flavonoides possuem efeito antimutagênico e anticarcinogênico (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

2.2.1. Compostos fenólicos em leguminosas

O interesse nos fitoquímicos presentes nas leguminosas é crescente, pois além de fazerem parte da alimentação cotidiana fornecendo nutrientes, esses grãos têm mostrado ser fonte de compostos bioativos ligados à prevenção de doenças degenerativas, como o câncer e o diabetes.

Os fitoquímicos de maior relevância no grupo das leguminosas são os compostos fenólicos. Xu, Yuan e Chang (2007) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos totais em diversas leguminosas, entre elas ervilha amarela, ervilha verde, lentilhas, feijão, soja e grão de bico. Entre as amostras avaliadas a lentilha apresentou maior conteúdo de fenólicos totais (6,96 mg equivalente ácido gálico (EAG)/ g amostra), seguida das amostras de soja preta (5,57 mg EAG/ g amostra) e então das amostras de feijão (4,04 mg EAG/ g amostra). As demais amostras, soja amarela, ervilhas verdes e amarelas, não tiveram diferença significativa entre si, variando de 0,81 - 1,71 mg EAG/ g amostra. Amostras de feijão do tipo fava conservadas no banco de germoplasma brasileiro foram avaliadas quanto ao conteúdo de fenólicos totais, o qual variou de 0,11 a 9,72 mg EAG/g, sendo que as menores concentrações foram encontradas nas amostras de casca branca (AGOSTINI-COSTA et al., 2015). Em amostras de casca de feijão comum consumidas no Brasil e no México, o conteúdo de fenólicos totais variou de 5,46 mg EAG/g casca para a Pinto-Saltillo até 15,5 mg EAG/g casca para a variedade Negro-Frijozac (consumidas no México). Os autores inferem que a variação no conteúdo de fenólicos totais pode ser associada ao genótipo e não às condições de cultivo, já que as amostras provenientes do México utilizadas neste estudo foram cultivadas sob as mesmas condições (MOJICA et al., 2015).

Diversos polifenóis podem ser encontrados nas leguminosas. Lin et al. (2006) avaliaram a presença destes compostos bioativos em 19 variedades de leguminosas utilizadas para consumo doméstico. As análises de fenólicos e flavonoides totais mostraram que 9 variedades estudadas, dentre elas soja preta, soja comum e feijão azuki, eram boas fontes de compostos bioativos. A análise cromatográfica de isoflavonas em extratos de soja revelou a presença de daidzeína, genisteína e gliciteína, na forma glicosídica e também agliconas. Os autores inferem que embora a composição fenólica seja dependente da variedade e do estágio germinativo, a composição de isoflavonas foi bastante similar nas variedades de estudo. Nesta avaliação, os grãos de soja preta apresentaram menor quantidade de isoflavonas quando comparados aos grãos de soja comum, entretanto, de maneira geral, grãos com casca escura, como feijão azuki e soja preta, contém elevada quantidade de polifenóis e elevado potencial antioxidante.

Variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) foram analisadas quanto ao seu perfil fenólico por Lin et al. (2008), utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Segundo estes autores, todas as variedades continham os mesmos ácidos hidroxicinâmicos: p-cumárico, sinápico e ferúlico. Entretanto, a composição dos flavonoides era bem distinta. O feijão preto continha as formas glicosídicas da delphinidina, petunidina e malvidina, já o “pinto beans” continha campferol e seus glicosídeos. O feijão vermelho (light red kidney bean)

apresentou traços de quercetina-3-glicosídeo, enquanto que, o feijão rosa e vermelho escuro (dark red kidney beans) continham diglicosídeos de quercetina e campferol.

Ojwang, Dykes e Awika (2012) investigaram o perfil de antocianinas e flavonóis em grãos de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) de diferentes genótipos utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS). Estes autores analisaram os genótipos preto, vermelho, verde, branco, marrom claro e marrom dourado. Foram encontradas 8 antocianinas e 23 flavonóis. Quercetina e suas formas glicosídicas foram predominantes na maioria dos fenótipos, enquanto que miricetina e campferol glicosídeos foram identificados apenas em fenótipos específicos como nas variedades preta e vermelha. Apenas as variedades de cor preta e verde continham antocianinas, principalmente delphinidina e cianidina-3-o-glicosídeo. A partir deste estudo pode-se concluir que os fenótipos de feijão caupi influenciaram o tipo e a quantidade de flavonoides presentes nas sementes, o que, conseqüentemente, influenciará nos efeitos à saúde proporcionados por estes grãos.

O feijão branco mostrou em sua composição a presença de ácidos fenólicos, em especial os hidroxicinâmicos, como o trans-ferúlico e derivados do ácido sinápico. Além destes, foram encontradas flavanonas no extrato deste feijão. Já o feijão roxo apresentou flavonóis como catequina e quercetina (e seus derivados), além de antocianinas (pelargonidina-glicosídeo e cianidina-glicosídeo) responsáveis pela coloração roxa (GARCIA-LAFUENTE et al., 2014).

Em quinze cultivares de feijão, provenientes do México e do Brasil, foram identificados 17 compostos fenólicos não-coloridos, sendo que, entre eles, catequina, miricetina-3-O-arabinosídeo, epicatequina, ácido vanílico, ácido siríngico e, ácido o-cumárico foram encontrados em maiores quantidades nas amostras (MOJICA et al., 2015).

Em trabalho recente, Huber et al. (2016) avaliaram extrato de feijão marrom, da cultivar Cometa, produzida no Brasil. Estes autores verificaram presença dos ácidos vanílico, gálico, clorogênico e sinápico. Já entre os flavonoides foram encontradas catequina, quercetina e quercetina-3-glicosídeo, além de campferol-3-glicosídeo e campferol-3-rutinosídeo.

Como se pode verificar, as leguminosas, presentes na alimentação da população mundial, apresentam composição fenólica bastante diversificada, tendo potencial para atuar como fonte de compostos fenólicos, os quais são conhecidos por seu potencial benéfico à saúde.

2.3. Atividade antioxidante

Entre os efeitos benéficos à saúde, exercidos pelos compostos fenólicos, está sua capacidade antioxidante, importante nos sistemas biológicos, já que, durante o processo respiratório são gerados radicais livres, produzidos naturalmente pelo organismo ou ligados a alguma disfunção biológica (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

As espécies reativas (radicais livres) são formadas a partir de um elétron desemparelhado, tanto no átomo de oxigênio (espécies reativas de oxigênio - ERO) como no átomo de nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio - ERN). No organismo, podem estar envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento e proliferação celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; CERQUEIRA;

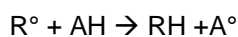
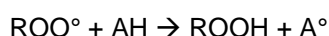
MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Entretanto, a produção excessiva de radicais livres causa prejuízos ao sistema biológico, através da peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Devido a estes fatos, os radicais livres estão relacionados ao aparecimento e agravamento de patologias como artrite e outras doenças inflamatórias, diabetes, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, câncer, doenças neurológicas, hipertensão, asma e AIDS (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Porém, os efeitos prejudiciais causados pelos radicais livres não ficam restritos apenas aos danos à saúde, estão relacionados também à perda da qualidade sensorial e nutricional de diversos alimentos, devido a sua atuação no processo de oxidação lipídica (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Em condições fisiológicas normais, o organismo promove a compensação entre os níveis de radicais livres presentes no organismo e os níveis de defesas antioxidantes endógenas. Caso estas defesas naturais sejam insuficientes frente à excessiva produção de radicais livres, ocorre o chamado estresse oxidativo, o qual está intimamente relacionado ao aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (câncer, depressão, Alzheimer, problemas cardiovasculares, entre outras) (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Os radicais livres participam do processo oxidativo promovendo a iniciação e a progressão das reações em cadeia, sendo assim, a interrupção da propagação das reações em cadeia torna-se essencial. Para isso são utilizados compostos conhecidos como antioxidantes (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Gutteridge e Halliwell (2010) definem antioxidante como qualquer substância que retarda, impede ou elimina o dano oxidativo de uma molécula alvo. Na indústria de alimentos, os antioxidantes são aplicados em produtos com o intuito de retardar ou impedir o processo de oxidação de seus componentes, pois as transformações do produto resultantes da oxidação, como as alterações físico-químicas indesejáveis e alterações das características sensoriais, interferem na qualidade do produto (RAMALHO; JORGE, 2006). No organismo, as substâncias antioxidantes presentes no corpo (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e glutathione) e aquelas provenientes da dieta auxiliam no combate ao estresse oxidativo (DEL RÉ; JORGE, 2012; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários, onde se encontram os sinérgicos, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos. Os antioxidantes primários podem atuar removendo ou inativando os radicais livres formados nas etapas de iniciação e propagação da reação de oxidação, doando átomos de hidrogênio para estas espécies reativas (RAMALHO e JORGE, 2006). O mecanismo de ação dos antioxidantes é exemplificado a seguir:



Onde ROO° e R° são radicais livres, AH antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A° radical inerte.

Durante esta reação os radicais ROO° e R° captam o hidrogênio ativo proveniente do antioxidante, tornando-se estáveis. O radical formado a partir do antioxidante (A°) é inerte, estabilizado por ressonância, não sendo capaz de iniciar ou propagar as reações oxidativas (RAMALHO e JORGE, 2006).

O mecanismo de ação dos antioxidantes secundários é mais variado, os sinergistas apresentam pouco ou nenhum poder antioxidante, entretanto, potencializam o poder dos antioxidantes primários. Já os removedores de oxigênio captam o oxigênio presente no meio, tornando-os indisponíveis para propagação da reação de oxidação, sendo que o principal representante deste grupo é o ácido ascórbico. Os antioxidantes biológicos podem remover o oxigênio ou compostos reativos do sistema e neste grupo estão incluídas enzimas como a glucose oxidase e as catalases. Os agentes quelantes possuem a capacidade de complexar íons metálicos, como o cobre e o ferro (catalisadores da oxidação lipídica), através de um par de elétrons não compartilhado na estrutura molecular, sendo o mais comum deles o ácido cítrico. O grupo dos antioxidantes mistos inclui compostos de plantas estudados como antioxidantes, como por exemplo, os flavonoides (RAMALHO e JORGE, 2006).

2.3.1. Potencial antioxidante das leguminosas

O potencial antioxidante das leguminosas, em especial do feijão, tem sido avaliado por diversos autores nos últimos anos. Cultivares melhoradas de feijão comum, originárias do México e do Brasil, foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante utilizando o método de Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Segundo os autores, a capacidade antioxidante variou de 185,2 a 233,9 mmol equivalente Trolox (TE)/g de casca, não apresentando diferença significativa entre as variedades estudadas. Embora a composição e a concentração dos compostos fenólicos encontrados nas cultivares tenha sido diferente, isso não teve efeito sobre a atividade antioxidante mensurada pelo método de ORAC (MOJICA et al., 2015), já que cada composto fenólico pode contribuir de modo diferente no sequestro de radicais devido a sua estrutura química.

Oito cultivares de feijão brasileiras foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante por Palombini et al. (2013) pelos métodos de captura de radicais livres (DPPH, ABTS) e por redução do íon ferro (FRAP). A avaliação pelo método de captura de radical DPPH apontou potencial antioxidante superior para as variedades BRS Agreste e BRS Ametista, já na avaliação com FRAP, BRS Esplendor teve melhor desempenho. Em relação à capacidade de capturar o radical ABTS, BRS Agreste apresentou melhores resultados. Embora os métodos DPPH e ABTS apresentem o mesmo princípio de ação, que é a transferência de elétrons, este último tem a habilidade de avaliar o potencial antioxidante de substâncias lipofílicas e hidrofílicas, característica não observada no primeiro método devido a problemas associados à solubilidade (DASTMALCHI et al., 2011).

O efeito do processamento térmico sobre a atividade antioxidante das leguminosas tem despertado interesse dos pesquisadores. Grãos de bico e ervilhas verde processados foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante pelo método DPPH e ABTS. As amostras cruas apresentaram maior potencial antioxidante, indicando que as técnicas de processamento modificaram o conteúdo e a atividade antioxidante dos grãos. Estas mudanças podem ser atribuídas à

combinação de efeitos sinérgicos ou à combinação de diferentes fatores como, reação de oxidação, lixiviação de componentes antioxidantes solúveis em água e perda de sólidos durante o processamento (NITHIYANANTHAM, SELVAKUMAR; SIDDHURAJU, 2012).

Huber et al. (2014) avaliaram o efeito do processamento térmico sobre a atividade antioxidante, mensurada pelos métodos de captura do radical DPPH e ABTS, de grãos de feijão branco. Pelo método de DPPH as amostras de feijão cru apresentaram potencial antioxidante de 2,96 mg TE/ g extrato, enquanto que as amostras maceradas e cozidas apresentaram maior potencial (8,46 mg TE/ g extrato). As demais amostras que foram cozidas sem maceração apresentaram potencial de 6,44 mg TE/ g extrato. Pelo método de ABTS, os extratos de feijão cru (14,92 mg TE/ g extrato), feijão macerado e cozido (15,04 mg TE/ g extrato) e feijão cozido sem maceração (13,70 mg TE/ g extrato) não apresentaram diferença significativa entre si. Com estes resultados, os autores concluem que, de maneira geral, o tratamento térmico aumentou o potencial antioxidante do feijão branco.

Ranilla, Genovese e Lajolo (2009) avaliaram a influência da forma de processamento e da temperatura sobre a atividade antioxidante de feijão preto, do tipo FT Nobre, pelo método de DPPH. Segundo estes autores, os fatores que mais afetaram as respostas foram a maceração e a drenagem da água de maceração. A capacidade antioxidante foi superior nos tratamentos sem maceração e sem descarte da água de cocção. Nas amostras cruas a atividade foi de 5,8 $\mu\text{mol TE/ g}$ amostra em base seca, enquanto que, nas amostras processadas o potencial variou de 1,9 a 7,3 $\mu\text{mol TE/ g}$ amostra em base seca.

2.4. Bioacessibilidade e Biodisponibilidade

O estudo dos efeitos dos compostos bioativos, como os fenólicos, envolvem aspectos relacionados com a biodisponibilidade destes compostos no organismo (CARBONELL-CAPELA et al., 2014). A biodisponibilidade de um nutriente ou composto bioativo refere-se à quantidade que é absorvida pelo corpo e se torna disponível para ser utilizada no local de ação (PARADA e AGUILERA, 2007; JACOB et al., 2012). Fernández-García, Carvajal-Lérida e Pérez-Gálvez (2009) ressaltam aspectos envolvidos na avaliação da biodisponibilidade como: disponibilidade para absorção, metabolismo, distribuição nos tecidos e bioatividade. Como se pode verificar o estudo da biodisponibilidade é bastante complexo e envolve também a bioacessibilidade do nutriente, compreendida como a fração do analito de interesse que é liberada da matriz alimentar e se torna disponível para absorção no trato gastrointestinal (PARADA e AGUILERA, 2007; JACOB et al., 2012; CARBONELL-CAPELA et al., 2014). Já a bioatividade refere-se a resposta fisiológica (benefício à saúde) produzida enquanto o composto bioativo interage com as biomoléculas (FERNÁNDEZ-GARCÍA, CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

Sendo assim, conhecer a bioacessibilidade dos compostos fenólicos para o sistema humano é de suma importância para avaliar a sua relevância na melhoria da saúde das pessoas (CHUNG, 2009). Para este fim, metodologias *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizadas na avaliação da bioacessibilidade de nutrientes. Os testes *in vivo*, apesar de permitirem estudos farmacocinéticos e avaliação de populações específicas, demandam muito tempo para sua execução, apresentam custo

elevado, e, além disso, questões éticas e limitações analíticas (como a falta de padrões analíticos certificados) são algumas das desvantagens encontradas neste tipo de estudo. Já os testes *in vitro* podem fornecer informação sobre a eficiência de cada etapa da digestão, tem menor custo, podem ser automatizados e demandam menor tempo de execução. Entre as desvantagens dos métodos *in vitro* está a necessidade de validação com dados obtidos *in vivo*, além, do fato de que, nesses métodos, nem todos os processos dinâmicos do organismo vivo são reproduzidos (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; CARBONELL-CAPELA et al., 2014; CARDOSO et al., 2015).

Os fatores determinantes na avaliação dos efeitos benéficos à saúde exercidos pelos polifenóis são a estabilidade ao processo gastrointestinal e a sua bioacessibilidade (TAGLIAZUCCHI et al., 2010), isto inclui liberação da matriz alimentar, tamanho da partícula, transformações decorrentes da variação do pH, reações de oxidação e interações com os componentes da matriz, como as proteínas, e até mesmo com outros polifenóis (STAHL et al., 2002; ALMINGER et al., 2014). De maneira geral, o conteúdo bioacessível de um nutriente costuma ser menor do que aquele encontrado na matriz alimentar, já que durante o processo digestivo diversos fatores irão influenciar na estabilidade do composto (CARDOSO et al., 2015).

2.4.1. Fatores que afetam a bioacessibilidade de polifenóis

O conteúdo e a forma como se encontram os compostos fenólicos nos alimentos afetam diretamente a sua bioacessibilidade no organismo e, por isso, alguns dos principais fatores interferentes da bioacessibilidade serão relatados a seguir.

A distribuição e o conteúdo de polifenóis nos alimentos é bastante variado. Como estas substâncias estão relacionadas com o sistema de defesa das plantas, a produção destes fitoquímicos varia de acordo com a informação genética de cada vegetal. Além disso, a distribuição dos polifenóis nos alimentos não é uniforme, uma vez que quantidades superiores de polifenóis são encontradas nas partes não comestíveis, como cascas e sementes (VAN DER SLUIS et al., 2001; MOURE et al., 2001).

Fatores externos, como as condições climáticas, técnicas de cultivo, exposição à radiação solar e, época da colheita também exercem influência na distribuição e na quantidade de polifenóis dos alimentos (VAN DER SLUIS et al., 2001; DU PONT et al., 2000). A exposição aos raios ultravioleta estimula a produção de flavonoides (CORTELL e KENNEDY, 2006). Já o amadurecimento afeta de forma diferente as diversas classes de polifenóis, levando a redução no teor de taninos (TANAKA et al., 1994) e ao aumento no teor de antocianinas (HERNANDEZ et al., 1999) em determinados vegetais..

As condições de armazenamento também podem influenciar a quantidade de polifenóis presentes nos alimentos. A estocagem de frutas a temperatura ambiente pode causar redução na quantidade de alguns compostos fenólicos devido às reações de oxidação e, isto, conseqüentemente, pode afetar a qualidade dos alimentos, devido à perda de coloração e de características sensoriais (DU PONT et al., 2000; VAN DER SLUIS et al., 2001; MANACH et al., 2004). Já o armazenamento sob refrigeração permite maior preservação dos compostos fenólicos (VAN DER SLUIS et al., 2001).

Em preparações culinárias onde há fragmentação, a simples ação de descascar os alimentos, como frutas e outros vegetais, faz com que grande parte dos polifenóis seja perdida, já que a maior parte destas substâncias encontra-se localizada na parte mais externa da fruta (DU PONT et al., 2000; MANACH et al., 2004).

A cocção, sempre presente nas preparações alimentícias, é responsável por modificações nos fitoquímicos, Perla, Holm e Jayanty (2012) investigaram os efeitos de diferentes métodos de cocção sobre o conteúdo fenólico de variedades de batata e, inferiram que o conteúdo total de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e flavonóis foram significativamente reduzidos pelo forneamento e pela cocção em microondas, porém, a fervura das batatas proporcionou menor perda dessas substâncias. Foi verificado também que estes processamentos causaram redução na atividade antioxidante apresentada inicialmente pelas batatas. Faller e Failho (2009) avaliaram o efeito da cocção sobre diferentes vegetais, como brócolis, batata, cebolas, cenoura e repolho branco, onde verificou-se que a cocção leva a alterações no conteúdo fenólico. Os autores ainda ressaltam que a real ingestão de fitoquímicos pode ser superestimada caso seja considerado o conteúdo presente nos vegetais crus.

Siah et al. (2014) avaliaram o efeito da maceração, fervura e da autoclavagem sobre grãos de fava. Segundo os autores, estes processamentos levaram a perdas no conteúdo fenólico e na atividade antioxidante, porém, ressaltam que uma quantidade substancial de compostos fenólicos foi retida nos feijões cozidos. Em estudo realizado com feijão preto e “pinto beans”, Xu e Chang (2009) observaram que, tanto o processo de cocção sob alta pressão, quanto o processo à pressão atmosférica, causaram redução no conteúdo de compostos fenólicos bem como na atividade antioxidante dos feijões avaliados.

Os polifenóis podem ainda interagir com macromoléculas presentes na matriz alimentar, o que também leva à alteração na disponibilidade destes compostos. As interações mais comuns ocorrem entre polifenóis e proteínas, carboidratos, fibras, lipídeos e alcoóis (D ARCHIVIO, 2010).

Roura et al. (2007) avaliaram a biodisponibilidade dos flavonoides presentes no cacau em pó consumido com leite e verificaram que a ingestão de leite não tem influência na biodisponibilidade dos polifenóis no organismo. Entretanto, segundo Bandyopadhyay, Ghosh e Ghosh (2012), as interações entre compostos fenólicos e proteínas dependem de vários fatores como: estrutura dos polifenóis, estrutura das proteínas e fatores extrínsecos como pH e temperatura. Sendo assim, dependendo destes fatores, pode haver interferência nas atividades biológicas dos polifenóis e também das proteínas presentes no alimento.

A respeito dos efeitos da interação entre os compostos fenólicos e os carboidratos ainda há controvérsias, visto que, segundo Boyer, Brown e Liu (2005), a bioacessibilidade da quercetina-3-glicosídeo, presente em cebolas, foi maior em comparação a quercetina aglicona. Estes autores atribuem a estabilidade da forma glicosídica à ligação com a molécula de açúcar. Entretanto, Meng et al. (2004), que avaliaram a absorção de resveratrol e quercetina de suco de uva (rico em açúcares) em humanos, mostraram que as formas glicosídicas do resveratrol e da quercetina são menos absorvidos do que as agliconas.

A interação entre polifenóis e lipídeos foi avaliada por Ortega e colaboradores (2009). Neste estudo foram utilizadas amostras de cacau, líquido com aproximadamente 50% de gordura e cacau em pó com aproximadamente 15% de gordura. Através desta avaliação os autores puderam verificar que quanto maior o teor de gordura presente nas amostras, maior era a digestibilidade dos fenólicos, em especial das procianidinas. Os autores ainda afirmaram que o maior conteúdo lipídico no líquido de cacau exerce efeito protetor durante a digestão, provavelmente devido a melhor micelarização que favorece a estabilidade dos fenólicos. Já em relação à bioacessibilidade dos polifenóis, foi observado que a gordura não afeta a solubilização destes compostos na fração aquosa.

Palafox-Carlos, Ayala-Zavala e Gonzalez-Aguilar (2011) relatam que a absorção de compostos fenólicos é reduzida na presença de fibras, isto porque as fibras ligam-se aos polifenóis durante a digestão no intestino delgado, impedindo sua absorção. Para que haja absorção destas substâncias são necessárias hidrólises enzimáticas nas matrizes das fibras.

2.4.2. Métodos para avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos *in vitro*

Para avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos *in vitro* têm sido desenvolvidas metodologias que simulam as condições fisiológicas e os eventos que fazem parte do processo digestivo encontrado no organismo humano. Entre as etapas avaliadas durante a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* estão contempladas as três grandes fases do sistema digestivo, que ocorrem na boca, no estômago e no intestino. Neste tipo de avaliação são controlados parâmetros como temperatura, agitação, composição da saliva, suco gástrico, duodenal e biliar (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; PEREIRA, 2014).

Miller et al. (1981) iniciaram os estudos de bioacessibilidade *in vitro* propondo um modelo de digestão para avaliar a bioacessibilidade do ferro. Em 2002, Gil-Izquierdo, Zafrilla e Tomás-Barberan (2002) propuseram um modelo de digestão *in vitro* para avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos em alimentos, o qual é um dos mais utilizados como base em experimentos de bioacessibilidade de polifenóis (VALLEJO et al., 2004; LIANG et al., 2012; HACHIMBAMBA et al., 2013; CORREA-BETANZO et al., 2014). A partir daí, as metodologias vêm sendo aprimoradas e modificadas para adaptação a diferentes amostras, ou para avaliação de diferentes analitos. Apesar de necessárias, estas modificações dificultam a interpretação dos dados sobre a bioacessibilidade dos fitoquímicos devido ao elevado número de métodos publicados atualmente, o que significam diferentes “condições fisiológicas” (ALMINGER et al., 2014).

Os modelos de digestão *in vitro* podem ser divididos em: estático e dinâmico. No modelo estático não são reproduzidos alguns processos físicos como trituração, peristaltismo e mudanças das condições ao longo do tempo. Já os métodos dinâmicos tentam imitar os processos de mudança na viscosidade do digerido, redução do tamanho da partícula e difusão de nutrientes (PARADA e AGUILERA, 2007; FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; PEREIRA, 2014).

Os modelos estáticos permitem a avaliação de um grande número de amostras e também de diversas condições experimentais, com baixo custo para sua execução. Neste tipo de simulação,

principalmente dois estágios são mimetizados: a etapa gástrica e a intestinal (duodenal), entretanto, deve-se levar em consideração a presença de fibras ou carboidratos complexos durante a análise de bioacessibilidade de fitoquímicos (como os polifenóis). Nestes casos, a digestão do amido e o tamanho da partícula são de grande relevância (ALMINGER et al., 2014). Em alguns casos etapas adicionais, como a diálise, são introduzidas (RODRIGUEZ-ROQUE et al., 2013), entretanto, trabalhos como o de Bermúdez-Soto et al. (2007) mostraram que a inclusão da diálise na avaliação da bioacessibilidade de polifenóis reduziu a recuperação destes compostos após a digestão. Além disso, as membranas de diálise simulam apenas a difusão passiva no intestino (Tenore et al., 2013), que é apenas um dos mecanismos pelo qual os polifenóis podem ser absorvidos no intestino (Manach et al., 2004).

Por outro lado, os modelos dinâmicos possibilitam a obtenção de dados mais próximos daqueles observados *in vivo*, já que permitem simular mudanças contínuas das condições físico-químicas, como variação de pH, alteração na concentração enzimática e peristaltismo. Todavia, os modelos dinâmicos demandam maior tempo e custo para sua execução, além de necessitar de maior volume de substâncias, que são continuamente adicionadas ao sistema. Este modelo é mais adequado para confirmação dos dados obtidos nos modelos estáticos e para obter informações mais detalhadas sobre as mudanças que ocorrem ao longo do processo digestivo (ALMINGER et al., 2014).

O método estático de digestão *in vitro* é útil para avaliar quais condições afetam a bioacessibilidade dos compostos de interesse, como pH e a presença de enzimas digestivas. Além disso, pode fornecer valiosa informação sobre a interação entre o analito alvo e os outros componentes da matriz alimentar, como as proteínas, fibras, carboidratos e lipídeos (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

Embora as condições utilizadas nos estudos *in vitro* baseiem-se nas condições encontradas *in vivo*, estudos de validação são necessários para avaliar a limitação destes modelos. Mesmo com estas limitações, os modelos *in vitro* têm fornecido informações valiosas para as análises com fitoquímicos. Os avanços na compreensão dos resultados obtidos *in vitro* e o avanço tecnológico tem proporcionado informações de grande relevância nos estudos de biodisponibilidade (ALMINGER et al., 2014).

Referências

- AFONSO, S. M. E. **Caracterização Físico-Química e Atividade Antioxidante de Novas Variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*)**. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico, Bragança, 2010.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; TEODORO, A. F. P.; ALVES, R. B. N.; BRAGA, L. R.; RIBEIRO, I. F.; SILVA, J. P.; QUINTANA, L. G.; BURLE, M. L. Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian Genebank. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 2, p. 335-341, 2015.

- ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S. N.; GOMES, A.; KARAKAYA, S.; MATÍNEZ-CUESTA, M. C.; MCDUGALL, G. J.; REQUENA, T.; SANTOS, C. N. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 13, p. 413-436, 2014.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, p. 191-203, 2006.
- BANDYOPADHYAY, P.; GHOSH, A. K.; GHOSH, C. Recent developments on polyphenol-protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. **Food & Function**, Cambridge, v. 3, p. 592-605, 2012.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113 -123, 2006.
- BERMÚDEZ-SOTO, M. J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, London, v. 102, p. 865-874, 2007.
- BOYER, J.; BROWN, D.; LIU, R. H. *In vitro* digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer. **Nutrition Journal**, London, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2005.
- CARBONELL-CAPELA, J. M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, Chicago, v. 13, p. 155-171, 2014.
- CARDADOR-MARTINEZ, A.; ALBORES, A.; BAH, M.; CALDERÓN-SALINAS, V.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.; SHIMADA-MIYASAKA, A.; LOARCA-PIÑA, G. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, p. 161-168, 2006.
- CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; COSTA, S.; NUNES, M. L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 41, p. 5-23, 2015.
- CARRATU, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Annali-Istituto Superiore Di Sanita**, Roma, v. 41, n. 1, p. 7, 2005.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- CHUNG, H. **Characterization of antioxidant activities of soybeans and assessment of their bioaccessibility after *in vitro* digestion**. 2009. 127 f. Dissertation (Doctor of Philosophy in Food Science and Technology) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2009.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, v. 4, p. 1-160, 2017.

- CORREA-BETANZO, J.; ALLEN-VERCOE, E.; MCDONALD, J.; SCHROETER, K.; CORREDIG, M.; PALIYATH, G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 522-531, 2014.
- CORTELL, J. M.; KENNEDY, J. A. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 22, p. 8510-8520, 2006.
- D ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASSELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 11, p. 1321-1342, 2010.
- DASTMALCHI, K.; FLORES, G.; PETROVA, V.; PEDRAZA-PEÑALOSA, P.; KENNELLY, E. J. Edible Neotropical Blueberries: Antioxidant and Compositional Fingerprint Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 3020-3026, 2011.
- DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.
- DUPONT, M. S.; MONDIN, Z.; WILLIAMSON, G.; PRICE, K. R. Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3957-3964, 2000.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo do Feijoeiro Comum. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/>>. Acesso em: 02 de dezembro de 2015.
- FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. **Food Research International**, Barking, v. 42, p. 210-215, 2009.
- FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, New York, v. 29, p. 751-760, 2009.
- GARCIA-LAFUENTE, A.; MORO, C.; MANCHÓN, N.; GONZALO-RUIZ, A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M.; MATEO-VIVARACHO, L. *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food Chemistry**, London, v. 161, p. 216-223, 2014.
- GIL-IZQUIERDO, A.; ZAFRILLA, P.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 214, p. 155-159, 2002.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 393, p. 561-564, 2010.

- HACHIMBAMBA, T.; DYKES, L.; AWIKA, J.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 48, p. 2638-2649, 2013.
- HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 54, p. 580-592, 2014.
- HERNANDEZ, F.; MELGAREJO, P.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ARTES, F. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 210, p. 39-42, 1999.
- HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, p. 937-942, 1999.
- HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. 2009. Disponível em: < <https://nutricaoclinicaeesteticabh.files.wordpress.com/2011/07/biodisponibilidade-de-compostos-bioativos.pdf>>. Acesso em: 11 de maio de 2015.
- HUBER, K.; BRIGIDE, P.; BRETAS, E. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Effect of Thermal Processing and Maceration on the Antioxidant Activity of White Beans. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. 1-8, 2014.
- HUBER, K.; BRIGIDE, P.; BRETAS, E. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Phenolic Acid, Flavonoids and Antioxidant Activity of Common Brown Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and After Cooking. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, Sunnyvale, v. 6, n. 5, 2016.
- JACOB, J. K.; TIWARI, K.; CORREA-BETANZO, J.; MISRAN, A.; CHANDRASEKARAN, R.; PALIYATH, G. Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. **Annual Review Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 3, p. 79-104, 2012.
- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 244 - 282, 2007.
- LIANG, L.; WU, X.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; ZOU, Y.; MAO, G.; YANG, L. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Research International**, Barking, v. 46, p. 76-82, 2012.
- LIN, L. -Z.; HARNLY, J. M.; PASTOR-CORRALES, M. S.; LUTHRIA, D. L. The polyphenolic profiles of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 399-410, 2008.
- LIN, P.; LAI, H. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 3807-3814, 2006.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C. RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 6, p. 271-278, 2002.
- MENG, X.; MALIAKAI, P.; LU, H.; LEE, M. J.; YANG, C. S. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 935-942, 2004.
- MESQUITA, F. R.; CORREA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.
- MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R.; CAMPEN, D. V. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 34, p. 2248-2256, 1981.
- MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, Barking, v. 69, p. 38-48, 2015.
- MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; CERVANTES-CARDOZA, V.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZALEZ-LAREDO, R. F.; ESTRELLA, I.; GARCIA-GASCA, T. J.; HERRERA-CARRERA, E.; DIAZ-RIVAS, J. O.; ROCHA-GUZMAN, N. E. Phenolic composition changes of processed common beans: Their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. **Food Research International**, Barking, v. 76, n. P1, p. 79-85, 2015.
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, p. 145-171, 2001.
- NITHIYANANTHAM, S.; SELVAKUMAR, S.; SIDDHURAJU, P. The phenolic content and antioxidant activity of two different solvent extracts from raw and processed legumes, *Cicer arietinum* L. and *Pisum sativum* L. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 27, p. 52-60, 2012.
- NYAU, V. Nutraceutical perspectives and utilization of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. **African Journal of Food, Agriculture Nutrition and Development**, Nairobi, v. 14, n. 7, p. 9483-9496, 2014.
- OJWANG, L. O.; DYKES, L.; AWIKA, J. M. Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry Profiling of Anthocyanins and Flavonols in Cowpea (*Vigna unguiculata*) of Varying Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 3735-3744, 2012.
- ORTEGA, N.; REGUANT, J.; ROMERO, M. P.; MACIA, A.; MOTILVA, M. J. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa Polyphenol by an *in vitro* digestion model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5743-5749, 2009.
- PALAFIX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. R6-R15, 2011.

- PALOMBINI, S. V.; MARUYAMA, S. A.; CLAUS, T.; MONTANHER, P. F.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V.; GOMES, S. T. M.; MATSUSHITA, M. Antioxidant activity of Brazilian bean cultivars. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 765-770, 2013.
- PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 21-32, 2007.
- PEREIRA, A. S. G. **Avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes em variedades de maçã produzidas em Portugal**. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, 2014.
- PERLA, V.; HOLM, D. G.; JAVANTY, S. S. Effects of cooking methods on polyphenols, pigments and antioxidant activity in potato tubers. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 45, p. 161-171, 2012.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RANILLA, L. G.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5734-5742, 2009.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAU, M. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, London, v. 136, p. 206-212, 2013.
- ROURA, E.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; ESTRUCH, R.; MATA-BILBAO, M. L.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; WATERHOUSE, A. L.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Basel, v. 51, p. 493-498, 2007.
- SIAH, S.; WOOD, J. A.; AGBOOLA, S.; KONCZAK, I.; BLANCHARD, C. L. Effect of soaking, boiling and autoclaving on the phenolic contents and antioxidant activities of faba beans (*Vicia faba* L.) differing in seed coat colours. **Food Chemistry**, London, v. 142, p. 461-168, 2014.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- STAHL, W.; BERG, H.V.D.; ARTHUR, J.; BAST, A.; DAINY, J.; FAULKS, R. M.; GARTNER, C.; HAENEN, G.; HOLLMAN, P.; HOLST, B.; KELLY, F. J.; POLIDORI, M. C.; RICE-EVANS, C.; SOUTHON, S.; VLIET, T. V.; VIÑA-RIBES, J.; WILLIAMSON, G.; ASTLEY, S. B. Bioavailability and metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, New York, v. 23, p. 39-100, 2002.
- STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, p. 3268-3295, 2007.
- TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, London, v. 120, p. 599-606, 2010.
- TANAKA, T.; TAKAHASHI, R.; KUONO, I.; NONAKA, G. Chemical Evidence for the De-astringency (Insolubilization of Tannins) of Persimmon Fruit. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions**, London, p. 3013-3022, 1994.

- TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; RITIENI, A.; NOVELLINO, E. *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). **Food Chemistry**, London, v. 141, p. 3519-3524, 2013.
- VALLEJO, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; PÉREZ-VICENTE, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 135-138, 2004.
- VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; JAGER, A.; JONGEN, W. M. F. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3606-3613, 2001.
- WANDER, A.E.; CHAVES, M.O. Consumo per capita de feijão no Brasil de 1998 a 2010: Uma comparação entre consumo aparente e consumo domiciliar. In: 10º Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão (CONAFE), 2011, Goiânia. **Anais eletrônicos** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/916073/1/soceco5.pdf>>. Acesso em: 09 jun. 2015.
- XU, B. J.; YUAN, S. H.; CHANG, S. K. C. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 167-177, 2007.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 11, p. 4754-4764, 2009.
- ZHAO, Y.; DU, S.; WANG, H.; CAI, M. *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chemistry**, London, v. 152, p. 462-466, 2014.

3. TRATAMENTO TÉRMICO POSSIBILITA AUMENTO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FEIJÃO COMUM

Resumo

Além de serem excelentes fontes de nutrientes essenciais, os feijões têm recebido atenção especial devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos e também ao seu potencial antioxidante. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tratamento térmico sobre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos feijões carioca (BRS Pérola) e preto (BRS Esteio). Os feijões foram avaliados quanto ao seu conteúdo de compostos fenólicos totais e ao seu potencial antioxidante pelos métodos de captura de radical livre DPPH (1,1 difenil-2-picrilidrazil) e ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)) e, capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), antes e após o tratamento térmico. Os tratamentos avaliados contemplaram a maceração dos grãos, cocção em panela aberta ou sob pressão, com ou sem a utilização da água de maceração. Para ambas as variedades de feijão, o tratamento térmico possibilitou aumento no conteúdo de compostos fenólicos livres e na atividade antioxidante pelos métodos avaliados. A maceração e a cocção mostraram-se importantes na liberação de compostos fenólicos ligados a matriz alimentar.

Palavras-chave: Leguminosas; Compostos bioativos; Polifenóis; Cocção; Processamento; Antioxidantes; *Phaseolus vulgaris* L.

Abstract

In addition to being excellent sources of essential nutrients, beans have received special attention due to their content of phenolic compounds and also their antioxidant potential. The objective of this study was to evaluate the influence of thermal treatment on the total phenolic content and antioxidant activity of carioca (BRS Pérola) and black beans (BRS Esteio). The beans were evaluated for their total phenolic compounds content and their antioxidant potential by free radical capture methods DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) and, Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), before and after the thermal treatment. The evaluated treatments contemplated the soaking of the grains, cooking in open pan or under pressure, with or without soaking water. For both bean varieties, the thermal treatment allowed an increase in the content of free phenolic compounds and antioxidant activity in the three evaluated methods. Soaking and cooking were important in the release of phenolic compounds bound to the food matrix.

Keywords: Legumes; Bioactive compounds; Polyphenols; Cooking; Processing; Antioxidants; *Phaseolus vulgaris* L.

3.1. Introdução

Muito conhecido por seu conteúdo nutricional, o feijão, é responsável por fornecer nutrientes essenciais, como proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais aos seus consumidores. Estudos recentes têm mostrado que, além de fornecer substâncias essenciais ao organismo, o feijão e outras leguminosas (grão de bico, lentilhas, ervilhas, etc) podem contribuir para a prevenção e/ou redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, diabetes, dislipidemias e obesidade (APARICIO-FERNÁNDEZ et al., 2006; BOUCHENAK e LAMRI-SENHADJI, 2013; HAYAT et al., 2014; LÓPEZ et al., 2013; SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2016; XU; CHANG, 2011).

Estes efeitos benéficos à saúde são proporcionados por diversos constituintes da matriz, entre eles destacam-se a fibra dietética, amido resistente e proteínas, bem como alguns inibidores de proteases, fitatos e saponinas. Além destas substâncias, os compostos fenólicos são a principal classe de fitoquímicos investigada nos últimos anos quanto ao seu efeito potencial na prevenção de doenças (GUTIÉRREZ-URIBE, ROMO-LOPEZ e SERNA-SALDÍVAR, 2011; HAYAT et al., 2014; MORENO-JIMÉNEZ et al., 2015; SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2016; XU; CHANG, 2012). Os compostos fenólicos encontrados nas leguminosas têm sido investigados quanto ao seu potencial antioxidante, já que a ingestão de antioxidantes tem papel importante na prevenção e/ou redução de risco de doenças (MARATHE et al., 2011; MOJICA et al., 2015; OROIAN e ESCRICHE, 2015; ZHAO et al., 2014). Entretanto, grande parte destes estudos é realizada com o grão cru, sendo pouco explorada a influência do processamento térmico sobre os compostos fenólicos e seu potencial antioxidante.

No dia a dia, o tratamento térmico das leguminosas é essencial para melhorar sua palatabilidade, promover amolecimento dos tecidos, aumentar a digestibilidade de carboidratos e proteínas, além de reduzir antinutrientes, como o ácido fítico e taninos (REHMAN; SALARIYA, 2005). Porém, este processo pode alterar o conteúdo de compostos bioativos destes alimentos. Alguns estudos feitos com leguminosas, incluindo feijão, afirmam que o tratamento térmico pode promover redução do potencial antioxidante e do teor de polifenóis (PEDROSA et al., 2015; SIAH et al., 2014; XU e CHANG, 2009). Por outro lado, outros trabalhos afirmam que o conteúdo de fenólicos, assim como sua atividade antioxidante, pode ser aumentado em relação à leguminosa crua por ação do processamento (HUBER et al., 2016; MORENO-JIMÉNEZ et al., 2015; RANILLA, GENOVESE e LAJOLO, 2009). Este comportamento controverso foi mostrado anteriormente por Turkmen, Sari e Velioglu (2005), que ao avaliarem diferentes vegetais (incluindo feijões verdes e ervilhas) quanto ao conteúdo de fenólicos totais e seu potencial antioxidante sob diferentes condições de processamento mostraram que, enquanto alguns vegetais sofreram aumento, outros sofreram redução nestes parâmetros dentro do mesmo método de cocção.

Além da influência da matriz alimentar, a forma de processamento aplicada pode afetar de maneira diferente o comportamento destes bioativos (GUILLÉN et al., 2017). Entre os métodos de preparação utilizados para leguminosas estão: cozimento por vapor, fervura, sob pressão, microondas e sous vide. Previamente a estas etapas é comum a realização da maceração dos grãos, comumente conhecida por reduzir o tempo de cocção dos mesmos (FABBRI e CROSBY, 2016).

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes formas de processamento térmico sobre o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de feijão mais consumidas no Brasil, os tipos carioca (BRS Pérola) e preto (BRS Esteio).

3.2. Materiais E Métodos

3.2.1. Material

Para desenvolvimento do presente estudo foram utilizados feijões carioca (BRS Pérola) e preto (BRS Esteio), por serem os tipos mais consumidos no Brasil. Os grãos foram doados pela Embrapa Arroz e Feijão. As amostras de feijão foram colhidas no mês de setembro de 2015, no município de Hidrolândia – GO. O plantio foi realizado no sistema orgânico de produção, com irrigação por aspersor convencional, a plantação foi adubada com esterco de galinha. A colheita foi semimecanizada, com arranque manual e triagem mecanizada. Após terem sido recebidas na ESALQ, Piracicaba – SP, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4°C) para melhor conservação.

3.2.2. Tratamentos

Os feijões foram analisados antes da cocção (T1), após maceração por 12 horas (T2), cozido em panela aberta com descarte da água de maceração (T3), cozido em panela aberta sem descarte da água de maceração (T4), cozido em panela de pressão com descarte da água de maceração (T5), cozido em panela de pressão sem descarte da água de maceração (T6). Para a análise foi utilizado todo o material após a cocção.

O tratamento T2 consistiu na imersão dos feijões em água destilada na proporção 1:3 (m/v) por 12 horas a temperatura ambiente. Os tratamentos T3 e T4 foram conduzidos em panela aberta de alumínio, em fogo baixo por 1 hora. Para T3 a proporção entre feijão e água destilada foi 1:14 (m/v) e para T4 1:10 (m/v). Os tratamentos T5 e T6 foram conduzidos em autoclave a 121°C sob pressão de 1 atm (semelhante a panela de pressão doméstica) por 10 minutos. Para o T5 a proporção entre feijão e água destilada foi de 1:2 (m/v) e para o T6 foi utilizada apenas a água de maceração. A quantidade de água a ser utilizada em cada um dos tratamentos foi previamente testada, para que ao final do processamento os feijões tivessem aproximadamente a mesma quantidade de material sólido.

3.2.3. Preparo de amostra

As amostras cruas (T1) foram armazenadas em temperatura de refrigeração (4°C) até o momento das análises, quando foram trituradas em moinho de facas (Marconi – modelo TE 345). Os grãos macerados (T2) e os cozidos (T3, T4, T5 e T6) foram homogeneizados com *mixer* para alimentos (Black & Decker – modelo SB40T), sendo utilizada a água de maceração e a água de cocção para homogeneização, respectivamente. Estas amostras foram submetidas à extração no mesmo dia de processamento, sendo as amostras cozidas homogeneizadas no máximo 2 horas após o cozimento.

3.2.4. Métodos

3.2.4.1. Extração dos compostos fenólicos

A extração de compostos fenólicos do feijão foi realizada de acordo com Ojwang, Dykes e Awika (2012) com modificações. Para extração dos compostos fenólicos foi utilizado metanol 70% com 1% de ácido acético. As amostras cruas e maceradas foram extraídas na proporção de 1:20 (m:v) e as cozidas 1:10 (m:v). Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação em mesa agitadora (Tecnal – TE-1401) a temperatura ambiente (26°C) durante 30 min. Logo após foi realizada a centrifugação (Novatecnica – NT825), a 3248 g durante 20 minutos, a 15°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em frascos âmbar, em freezer a -26°C para posteriormente ser utilizado nas análises.

3.2.4.2. Determinação da matéria seca

A determinação da quantidade de matéria seca presente nas amostras foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC (2006). Este dado foi utilizado para expressar os resultados em base seca.

3.2.4.3. Análise de compostos fenólicos totais (FT)

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando o método colorimétrico descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) com modificações. Para esta análise foram utilizados 200µL de extrato, 1500µL de água destilada e 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu, a mistura foi agitada e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de 20% NaCO₃, a solução foi agitada e deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos antes da leitura. A absorbância foi medida a 765nm (espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800). Para construção da curva de calibração, de 5 pontos, foi utilizado ácido gálico, com concentração variando de 0 a 0,08 mg/mL. O conteúdo total de fenólicos foi expresso como equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra em base seca.

3.2.4.4. Atividade antioxidante

3.2.4.5. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC, foi utilizada a metodologia descrita por Chisté et al., (2011), o qual utilizou método originalmente desenvolvido por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001). Em microplacas foram adicionados 30 µL de extrato, em seguida, 60 µL da solução de fluoresceína (508,25 mM) e 110 µL de AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidroclorato) (76 mM), todos diluídos em tampão fosfato (pH 7,4). A curva padrão foi construída utilizando soluções de Trolox nas concentrações de 12,5 a 400 µM. As microplacas foram mantidas a 37°C a fim de promover termodecomposição do AAPH e conseqüente geração de radicais peroxila,

enquanto o sinal da fluorescência foi monitorado a cada minuto, durante 2 horas, até total decaimento da fluorescência. Na leitura foram utilizados os comprimentos de onda de 528 nm para emissão e 485 nm para excitação. Os resultados foram calculados pela comparação das respostas obtidas para os extratos com a curva padrão do Trolox e expressos como $\mu\text{mol TE}$ por grama de amostra em base seca.

3.2.4.6. DPPH (1,1 difenil – 2 – picrilidrazil)

O método DPPH foi proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e baseia-se na redução do radical DPPH por compostos antioxidantes presentes nos extratos. Para este experimento foi utilizada uma alíquota de 0,5 mL de extrato e 3,0 mL de etanol 99% e 0,3 mL do radical DPPH (0,5mM em solução de etanol), a mistura foi incubada por 45 minutos ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada a 515 nm (espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800). Os resultados foram calculados segundo a curva padrão de Trolox, com concentração variando de 0 a 200 $\mu\text{mol/L}$ e, expressos como $\mu\text{mol TE}$ por grama de amostra em base seca.

3.2.4.7. ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)

A avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada conforme metodologia descrita por Re et al. (1999) com modificações. Para formação do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foi realizada reação entre 2,45 mM de persulfato de potássio com 7 mM de ABTS, a mistura foi armazenado no escuro a temperatura ambiente por 16 horas. O radical formado foi diluído com etanol até que o valor da absorbância atingisse $0,700 \pm 0,020$ em comprimento de onda de 734 nm (espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800). Para análise foram utilizados 20 μL de extrato, 2 mL do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ e, as absorbâncias foram lidas a 734 nm após 6 minutos de reação. A curva padrão foi construída utilizando-se soluções de Trolox nas concentrações de 0 a 2000 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol TE}$ por grama de amostra em base seca.

3.2.4.8. Análise estatística

Neste estudo foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente aleatorizado, com arranjo fatorial 2 tipos de feijão x 6 tratamentos, com 6 repetições. Para avaliação dos dados foi realizada análise de variância (ANOVA) com verificação de todas as pressuposições e comparação de médias (Tukey) ao nível de significância de 5% no sistema computacional SAS (Statistical Analysis System).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais variou para os dois tipos de feijão em todos os tratamentos avaliados, sendo que os feijões crus (T1) apresentaram menor conteúdo de fenólicos totais do que as demais amostras (Tabela 1).

O T2 apresentou maior conteúdo de fenólicos totais que os demais tratamentos avaliados, nos dois tipos de feijão. Neste tratamento os grãos foram submetidos à maceração por 12 horas em água destilada, este procedimento permitiu o início da germinação dos grãos, a qual, por sua vez, levou ao aumento na liberação de compostos fenólicos presentes nos grãos, isto porque, enzimas endógenas são ativadas neste processo, entre as enzimas relacionadas aos compostos fenólicos estão as hidrolases (DUEÑAS et al., 2009; LÓPEZ-AMORÓS; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 2006). López-Amorós, Hernández e Estrella (2006) verificaram que a germinação modifica quantitativa e qualitativamente a composição fenólica das leguminosas, pois algumas classes de polifenóis encontram-se ligadas aos constituintes da parede celular, podendo ser liberados pela ação enzimática durante o processo germinativo.

Tabela 1. Conteúdo de compostos fenólicos totais dos feijões carioca e preto submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento	Fenólicos Totais (mg EAG*/g amostra em base seca)	
	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)
T1	1,02 ± 0,03 ^{fB}	1,13 ± 0,03 ^{fA}
T2	3,43 ± 0,04 ^{aB}	3,73 ± 0,17 ^{aA}
T3	1,24 ± 0,03 ^{eB}	1,35 ± 0,01 ^{eA}
T4	2,70 ± 0,07 ^{cB}	3,12 ± 0,08 ^{cA}
T5	1,86 ± 0,03 ^{dB}	2,12 ± 0,02 ^{dA}
T6	2,99 ± 0,12 ^{bB}	3,48 ± 0,08 ^{bA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n=6. Letras minúsculas diferentes nas colunas (entre os tratamentos) ou letras maiúsculas diferentes nas linhas (entre os tipos de feijão) diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. *EAG: equivalente ácido gálico. T1= feijão *in natura*, T2= feijão macerado por 12 horas analisado com a água de maceração, T3= cocção em panela aberta sem adição da água de maceração, T4= cocção em panela aberta com adição da água de maceração, T5= cocção sob pressão sem adição da água de maceração, T6= cocção sob pressão com adição da água de maceração.

Nos tratamentos referentes às amostras maceradas e posteriormente cozidas (T3 a T6) pode-se verificar que estas continham conteúdo de fenólicos maior que as amostras cruas (T1), porém inferior às amostras maceradas (T2). Isto ocorreu, conforme já indicado, porque o processo de maceração ao qual as amostras foram submetidas antes do tratamento térmico possibilitou liberação de mais compostos fenólicos devido à ação das enzimas endógenas (DUEÑAS et al., 2009; LÓPEZ-AMORÓS; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 2006). Já o tratamento térmico é conhecido por causar a diminuição no conteúdo de polifenóis, seja por reações de oxidação ou perda de compostos hidrossolúveis ou sólidos durante o processamento (XU; CHANG, 2008a). Neste estudo, o tratamento

térmico promoveu a diminuição do conteúdo de fenólicos totais em comparação às amostras maceradas, porém, preservou maior quantidade de fenólicos livres do que as amostras cruas. Segundo Granito, Brito e Torres (2007) e D Archivio et al. (2010) o processamento térmico pode aumentar o conteúdo de fenólicos livres por causa da hidrólise das ligações químicas entre os polifenóis e macromoléculas presentes nos alimentos, como proteínas, carboidratos, fibras, etc. Podemos dizer então, que o conteúdo de polifenóis presentes nas amostras cozidas é resultante de um balanço entre as reações de oxidação, perdas e reações de liberação (hidrólise) que ocorrem durante o processamento das amostras. No presente estudo, pode-se afirmar que o processamento térmico aplicado (maceração seguida de cocção com ou sem a utilização da água de maceração) auxiliou na liberação de compostos fenólicos da matriz, aumentando assim o conteúdo de compostos fenólicos totais no feijão, quando comparado com as amostras cruas.

As amostras cozidas em panela aberta (T3 e T4) apresentaram menor conteúdo de polifenóis quando comparadas aquelas cozidas sob pressão (T5 e T6), isto porque, a cocção sob pressão diminui o tempo de processamento, causando menores perdas de polifenóis (XU; CHANG, 2008b). Os tratamentos que não contemplaram a utilização da água de maceração durante a cocção (T3 e T5) apresentaram menor conteúdo de fenólicos totais entre as amostras cozidas avaliadas, isso especialmente devido à lixiviação de compostos fenólicos que se solubilizaram na água de maceração (XU e CHANG, 2009).

Para melhor visualização da variação do conteúdo de compostos fenólicos totais nos diferentes tratamentos avaliados, a concentração de compostos fenólicos encontrado nas amostras de feijão cru foi considerada como 1 (ou 100%), com esta referência foi calculada a variação da concentração nos demais tratamentos (Figura 1). A observação da Figura 1 evidencia o que foi anteriormente abordado, aumento no conteúdo de fenólicos totais livres após a maceração, grãos cozidos apresentaram variação positiva na concentração de polifenóis em relação ao grão cru, maior concentração de fenólicos totais nas amostras cozidas sob pressão e com a água de maceração.

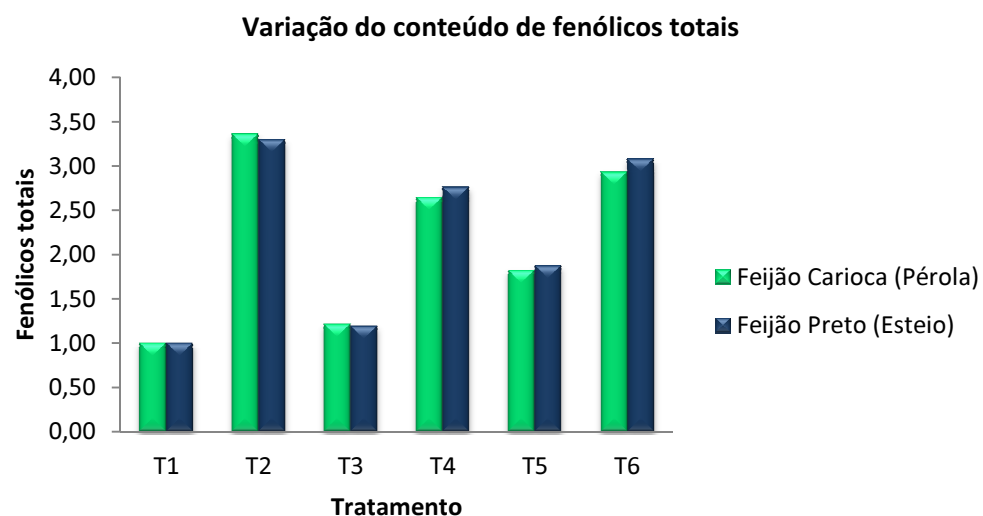


Figura 1. Variação do conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras de feijão submetidas a diferentes tratamentos.

Por se tratarem de compostos secundários, o conteúdo de polifenóis nas espécies vegetais é diversificado. Conforme observado no presente estudo, o feijão preto destacou-se em relação ao carioca em todos os tratamentos avaliados, apresentando maior conteúdo de fenólicos totais. Este comportamento está relacionado à informação genética das plantas, que influencia diretamente na distribuição dos compostos fenólicos (VAN DER SLUIS et al., 2001).

Ranilla, Genovese e Lajolo (2009) avaliaram feijões das variedades Jalo Precoce e FT Nobre sob diferentes formas de processamento, distintas das que foram utilizadas no presente estudo. Estes autores inferiram que, independente da temperatura de cocção, a concentração de compostos fenólicos totais aumentou em tratamentos sem maceração e sem descarte da água de cocção. Similarmente ao que ocorreu no presente trabalho, o processamento térmico foi capaz de promover o aumento dos compostos fenólicos livres. Em contrapartida, Siah et al. (2014) verificaram que a maceração, a fervura e cocção sob pressão reduziram o nível de compostos bioativos no feijão fava, entretanto, estes autores avaliaram separadamente a água de maceração e o caldo da cocção, dos grãos. Segundo eles, parte dos compostos é perdida nos meios de maceração e cocção.

3.3.2. Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e ORAC mostrou que, independente do método, utilizado, os extratos dos grãos crus (T1) decorrentes do feijão preto e carioca não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Porém, quando submetidos às diferentes formas de processamento este quadro se modifica (Tabela 2).

Na análise feita pelo método de DPPH pode-se perceber que o feijão preto teve maior destaque em relação ao feijão carioca em todos os tratamentos, com exceção do T1, em que os teores foram iguais. Isto provavelmente se deve à diferente composição fenólica entre os grãos, a qual irá influenciar em seu potencial antioxidante. Zhao et al. (2017) avaliaram o potencial antioxidante de diferentes compostos fenólicos contidos em uma mistura de padrões analíticos. Neste experimento, também foram utilizados os métodos de DPPH e ABTS. Os autores ressaltam em sua discussão que a estrutura química dos polifenóis influencia diretamente seu potencial antioxidante, têm a maior influência sobre o efeito antioxidante: o número de grupos hidroxila, a posição destes grupos na molécula e a presença de glicosídeos na estrutura. Em estudo com feijões foi demonstrado que a composição fenólica difere entre as variedades e, além disso, cada composto fenólico apresentou maior ou menor correlação com os métodos de avaliação da atividade antioxidante (XU e CHANG, 2009), evidenciando a relação com a estrutura química. A maceração dos feijões possibilitou aumento da atividade antioxidante em relação aos grãos crus. Os processos de cocção conduzidos sob pressão (T5 e T6) proporcionaram maior potencial antioxidante que aqueles conduzidos em panela aberta (pressão atmosférica) (T3 e T4), bem como maior potencial foi verificado nas amostras cozidas com a utilização da água de maceração. Estes resultados estão de acordo com os de Rocha-Guzmán et al. (2007a), que também verificaram que extratos de feijão cru não diferiram em sua atividade antioxidante, mas quando cozidos apresentaram diferença. Além disso, também mostrou que maior tempo de cocção tinha como consequência menor capacidade de combater os radicais livres. Parte deste comportamento pode ser explicado pela formação do complexo fenol-proteína, que

Tabela 2. Atividade antioxidante dos feijões carioca e preto submetidos a diferentes tratamentos, mensurada pelos métodos de DPPH, ABTS e ORAC.

Tratamento	DPPH ($\mu\text{mol TE}^*/\text{g}$ amostra em base seca)		ABTS ($\mu\text{mol TE}^*/\text{g}$ amostra em base seca)		ORAC ($\mu\text{mol TE}^*/\text{g}$ amostra em base seca)	
	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)
T1	7,61 \pm 0,65 ^{eA}	7,01 \pm 0,50 ^{fA}	17,22 \pm 0,96 ^{dA}	16,96 \pm 1,17 ^{cA}	31,37 \pm 1,08 ^{eA}	30,17 \pm 1,16 ^{cA}
T2	17,52 \pm 0,12 ^{aB}	20,30 \pm 0,95 ^{cA}	34,73 \pm 2,66 ^{aB}	41,28 \pm 3,84 ^{aA}	55,44 \pm 5,27 ^{cB}	60,34 \pm 1,73 ^{aA}
T3	8,65 \pm 0,22 ^{dB}	11,41 \pm 0,37 ^{eA}	17,96 \pm 1,60 ^{dA}	17,62 \pm 1,26 ^{cA}	44,66 \pm 1,90 ^{dA}	30,63 \pm 3,23 ^{cB}
T4	16,62 \pm 0,24 ^{bB}	23,44 \pm 0,71 ^{bA}	23,71 \pm 1,85 ^{cbB}	32,58 \pm 2,30 ^{bA}	67,02 \pm 2,09 ^{aA}	59,68 \pm 4,40 ^{aB}
T5	9,83 \pm 0,49 ^{cB}	16,85 \pm 0,45 ^{dA}	21,60 \pm 1,05 ^{cB}	33,71 \pm 1,58 ^{bA}	35,89 \pm 3,47 ^{eB}	50,71 \pm 2,37 ^{bA}
T6	17,20 \pm 0,32 ^{abB}	26,16 \pm 0,60 ^{aA}	25,82 \pm 2,55 ^{bB}	32,63 \pm 2,27 ^{bA}	61,13 \pm 3,00 ^{bA}	62,74 \pm 4,13 ^{aA}

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n=6. Letras minúsculas diferentes nas colunas (entre os tratamentos) ou letras maiúsculas diferentes nas linhas (entre os tipos de feijão) diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.*TE: trolox equivalente. T1= feijão *in natura*, T2= feijão macerado por 12 horas analisado com a água de maceração, T3= cocção em panela aberta sem adição da água de maceração, T4= cocção em panela aberta com adição da água de maceração, T5= cocção sob pressão sem adição da água de maceração, T6= cocção sob pressão com adição da água de maceração.

não tem efeito antioxidante. Em outro estudo sobre o potencial antioxidante de feijão marrom também foi verificado que o processo de cocção aumentou a atividade antioxidante, quando comparado aos extratos de feijão cru (HUBER et al., 2016).

Os resultados da atividade antioxidante pelo método de ABTS mostraram que o feijão preto teve potencial superior ao do feijão carioca em quase todos os tratamentos, exceto no T1 e T3, para os quais os dois feijões mostraram ter potencial equivalente. O T2 mostrou conter maior quantidade de compostos reativos ao radical ABTS⁺ que os demais tratamentos avaliados. Todas as amostras cozidas tiveram maior atividade antioxidante que as amostras cruas e menor do que as maceradas, mostrando que o processo de germinação (T2) auxilia na liberação de compostos fenólicos ligados à matriz. Comportamento semelhante foi verificado por Pajak et al. (2014) que avaliaram atividade antioxidante de sementes e brotos de feijão mungo pelo método de ABTS e, segundo eles, o aumento na atividade antioxidante durante a germinação se deve ao aumento do conteúdo de vitaminas e compostos fenólicos. Já, o tratamento térmico pode degradar compostos por oxidação, como também tem a capacidade de hidrolisar ligações entre fenólicos ligados a proteínas, por exemplo, aumentando o conteúdo de fenólicos livres (DUEÑAS et al., 2009; GRANITO, BRITO e TORRES, 2007). No caso do feijão carioca os tratamentos de cocção que utilizaram a água de maceração (T4 e T6) mostraram ter atividade equivalente mesmo utilizando métodos de cocção diferentes. Os tratamentos T3 e T5 apresentaram menor atividade antioxidante que os demais tratamentos, isto porque, nestes tratamentos a água de maceração não foi utilizada na cocção. No caso do feijão preto, os grãos cozidos no T4, T5 e T6 não apresentaram diferença entre si, mostrando que para este caso os dois tratamentos sob pressão (T5 e T6) foram equivalentes ao T4, em panela aberta com utilização da água de maceração. Porém, T3 mostrou ser inferior a todos os demais tratamentos, quando se trata da conservação de compostos capazes de neutralizar o radical ABTS⁺. Hagerman et al. (1998) afirmam que compostos fenólicos poliméricos (taninos) tem maior capacidade de neutralizar o radical ABTS⁺ do que as formas fenólicas monoméricas. A eficiência em combater este radical está ligada ao peso molecular, a proximidade de vários anéis aromáticos, bem como a presença e posição de grupos hidroxila.

Nithiyantham, Selvakumar e Siddhuraju (2012) avaliaram o efeito de diferentes formas de processamento térmico sobre grãos de bico e ervilhas. Segundo eles, o tratamento no qual as amostras de grão de bico foram aquecidas a 150°C sob calor seco proporcionou o aumento do potencial antioxidante avaliado pelo método de ABTS em relação à amostra crua. Estes autores avaliaram diferentes métodos de processamento para os grãos de bico e ervilhas, segundo eles, as modificações no potencial antioxidante dependem das condições de processo empregadas e do tipo de legume avaliado. Estudo desenvolvido com feijão branco submetido ao processo de cocção com ou sem a etapa de maceração, demonstrou que esta leguminosa tem atividade antioxidante semelhante a do grão cru, quando avaliada pelo método de ABTS (HUBER et al., 2014).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC mostrou resultados semelhantes aos dos outros métodos aqui utilizados (DPPH e ABTS). As amostras submetidas aos diferentes tipos de processamento avaliados apresentaram maior potencial para combater radicais livres do que as amostras cruas (T1). No caso do feijão carioca pode-se verificar que quase todos os

tratamentos diferiram entre si, exceto T5, que mostrou potencial igual a T1. As amostras cozidas com a água de maceração mostraram maior potencial que as demais, além disso, para o feijão carioca, o tratamento em panela aberta teve maior potencial no método de ORAC. Para o feijão preto, as amostras submetidas aos tratamentos T4 e T6 apresentaram mesmo potencial, mostrando para este caso que a cocção sob pressão ou em panela aberta mostraram-se iguais quanto aos compostos ativos ao radical do método avaliado. Porém, quando a água de maceração não foi utilizada (T3 e T5), a cocção sob pressão preservou melhor os compostos antioxidantes do extrato. A análise dos dados (Tabela 2) mostra que diferentemente do que ocorreu nos outros métodos de atividade antioxidante (DPPH e ABTS), no método de ORAC, nem sempre o feijão preto mostrou maior potencial do que o feijão carioca nos tratamentos avaliados. Isto porque, o tratamento térmico sob pressão pode aumentar a formação de compostos específicos que irão atuar como doadores de hidrogênio durante o processo de oxidação, já que, diferentemente dos métodos de DPPH e ABTS, onde os radicais são neutralizados prioritariamente por transferência de elétrons, o método de ORAC mensura a capacidade de neutralizar o radical peróxil através da transferência de um átomo de hidrogênio (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005; XU e CHANG, 2008a).

Em estudo recente, feijões do tipo fava foram submetidos aos processos de maceração e cocção sob pressão e à pressão atmosférica, sendo que neste caso foram analisados separadamente o caldo de cocção e os grãos. Após analisar a atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ORAC e FRAP, os autores perceberam que os processos de maceração e os dois métodos de cocção utilizados neste estudo reduziram o nível de compostos ativos do feijão fava, uma vez que, segundo os autores, parte dos compostos ativos é lixiviada para o meio de maceração e de cocção (SIAH et al., 2014). Estes resultados contrastam com os encontrados neste trabalho, porém, deve-se lembrar que no presente estudo o caldo de cocção e grãos cozidos foram avaliados em conjunto, representando a maneira como são consumidos no dia-a-dia.

Xu e Chang (2008a) verificaram diferente comportamento em leguminosas processadas (lentilhas, grãos de bico e ervilhas) por métodos distintos. Segundo eles, a avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC mostrou que a capacidade de neutralizar os radicais livres foi reduzida nos casos que contemplavam maceração e fervura a pressão atmosférica em comparação às amostras não processadas. Entretanto, nos casos de cocção por fervura sob pressão e cocção em vapor sob pressão, o potencial antioxidante foi aumentado em relação às amostras cruas. De acordo com as conclusões de Xu e Chang (2008a), o potencial medido por ORAC aumentou com o aumento da pressão, tanto na fervura como no tratamento com vapor.

Para avaliar a correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e os métodos de atividade antioxidante foi realizado o teste de correlação de Pearson. Segundo os resultados desta análise, os compostos fenólicos totais apresentaram correlação fraca e positiva com os métodos de DPPH ($r = 0,35$, $p < 0,05$) e ABTS ($r = 0,24$, $p < 0,05$), e não apresentaram correlação significativa com o método de ORAC ($p > 0,05$). Este comportamento diferenciado entre os métodos de avaliação do potencial antioxidante pode estar relacionado aos mecanismos de ação envolvidos em cada um dos métodos, conforme citado anteriormente. Na literatura, estudos realizados com feijão relatam que o conteúdo de compostos fenólicos totais tem forte correlação positiva com o potencial antioxidante (SIAH et al.,

2014; XU e CHANG, 2009; ZHAO et al., 2014), isto para a maioria dos casos. Por outro lado, há avaliações que relatam ausência de correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante (ROCHA-GUZMAN et al., 2007b; PALOMBINI et al., 2013), nesses casos a polaridade do solvente utilizado na extração pode influenciar a resposta. Rocha-Guzmán et al. (2007b) encontraram correlação forte e positiva entre fenólicos e atividade antioxidante em extrato composto por acetona, todavia não encontraram correlação entre estas variáveis para extratos compostos por metanol. Segundo os autores, isso pode estar relacionado à presença de carboidratos nos extratos metanólicos, pois se estas moléculas captam um elétron, elas não têm a capacidade de formar um radical estável, então, em pouco tempo o elétron é devolvido ao meio reacional.

Frente ao exposto, deve-se lembrar que o potencial antioxidante de um extrato vegetal está relacionado à presença de substâncias oriundas da matriz vegetal, pois a capacidade de combater os radicais livres está relacionada principalmente às vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides (HALLIWELL, 2012; THAIPOONG et al., 2006). No caso dos feijões, além dos polifenóis e vitaminas que são conhecidos por exercerem atividade antioxidante, outras substâncias como proteínas solúveis em água, peptídeos, aminoácidos e alguns oligossacarídeos das frações hemicelulósicas também tem sido relacionados à capacidade antioxidante destes alimentos (MOURE et al., 2001). Além disso, Huber et al. (2014) que avaliaram diferentes frações do extrato de feijão branco, sugerem que haja um efeito sinérgico dos diferentes compostos fenólicos sobre o potencial antioxidante do extrato, já que o potencial das frações isoladas é inferior ao do extrato bruto.

Através das avaliações realizadas neste estudo, nota-se que os feijões cozidos têm potencial para contribuir com a saúde de seus consumidores, pois fornecem compostos bioativos, como os compostos fenólicos, além de outras substâncias com potencial antioxidante.

3.4. Conclusão

O conteúdo de compostos fenólicos livres, assim como, a atividade antioxidante aumenta após os processos de maceração e cocção em relação às amostras cruas para os dois tipos de feijão avaliados. O processamento permitiu a liberação de compostos fenólicos que estavam ligados à matriz. De modo geral, entre os tratamentos avaliados, a cocção sob pressão com utilização da água de maceração resulta em maior preservação dos compostos fenólicos e do potencial antioxidante dos grãos.

Referências

- APARICIO-FERNÁNDEZ, X.; GARCÍA-GASCA, T.; YOUSEF, G. G.; LILA, M. A.; MEJIA, E. G.; LOARCA-PINA, G. Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 6, p. 2116–2122, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International 2006.

- BOUCHENAK, M.; LAMRI-SENHADJI, M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. **Journal of medicinal food**, New York, v. 16, n. 3, p. 185-198, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; BRAGAGNOLO, N. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, London, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.
- D ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the Polyphenols : Status and Controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, p. 1321–1342, 2010.
- DUEÑAS, M.; HÉRNANDEZ, T.; ESTRELLA, I.; FERNÁNDEZ, D. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). **Food Chemistry**, London, v. 117, n. 4, p. 599–607, 2009.
- FABBRI, A. D. T.; CROSBY, G. A. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, Amsterdam, v. 3, p. 2–11, 2016.
- GRANITO, M.; BRITO, Y.; TORRES, A. Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus*. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 2801–2809, 2007.
- GUILLÉN, S.; MIR-BEL, J.; ORIA, R.; SALVADOR, M. L. Influence of cooking conditions on organoleptic and health-related properties of artichokes, green beans, broccoli and carrots. **Food Chemistry**, London, v. 217, p. 209–216, 2017.
- GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; ROMO-LOPEZ, I.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. **Journal of Functional Foods**, London, v. 3, n. 4, p. 290–297, 2011.
- HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; RIECHEL, T. L. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 5, p. 1887–1892, 1998.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.
- HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton, v. 54, n. February 2013, p. 580–92, 2014.
- HUBER, K.; BRIGIDE, P.; BRETAS, E. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Effect of thermal processing and maceration on the antioxidant activity of white beans. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2014.

- HUBER, K.; BRIGIDE, P.; BRETAS, E. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Phenolic Acid, Flavonoids and Antioxidant Activity of Common Brown Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and After Cooking. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, Sunnyvale, v. 6, n. 5, 2016.
- LÓPEZ, A.; EL-NAGGAR, T.; DUEÑAS, M.; ORTEGA, T.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; GÓMEZ-SERRANILOS, M. P.; PALOMINO, O. M.; CARRETERO, M. E. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, London, v. 138, n. 1, p. 547–555, 2013.
- LÓPEZ-AMORÓS, M. L.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 4, p. 277–283, 2006.
- MARATHE, S. A.; RAJALAKSHMI, V.; JAMDAR, S. N.; SHARMA, A. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 2005–2012, 2011.
- MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, Barking, v. 69, p. 38–48, 2015.
- MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; CERVANTES-CARDOZA, V.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; ESTRELLA, I.; GARCÍA-GASCA, T. J.; HERRERA-CARRERA, E.; DÍAZ-RIVAS, J. O.; ROCHA-GUZMÁN, N. E. Phenolic composition changes of processed common beans: Their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. **Food Research International**, Barking, v. 76, n. P1, p. 79–85, 2015.
- MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Antioxidant activity of extracts from Gevuina avellana and Rosa rubiginosa defatted seeds. **Food Research International**, Barking, v. 34, n. 2–3, p. 103–109, 2001.
- NITHIYANANTHAM, S.; SELVAKUMAR, S.; SIDDHURAJU, P. Total phenolic content and antioxidant activity of two different solvent extracts from raw and processed legumes, *Cicer arietinum* L. and *Pisum sativum* L. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 27, n. 1, p. 52–60, 2012.
- OJWANG, L. O.; DYKES, L.; AWIKA, J. M. Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Quadrupole Mass Spectrometry Profiling of Anthocyanins and Flavonols in Cowpea (*Vigna unguiculata*) of Varying Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 3735–3744, 2012.
- OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, Barking, v. 74, p. 10–36, 2015.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

- PAJAŁ, P.; SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; ROZNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, London, v. 143, p. 300–306, 2014.
- PALOMBINI, S. V.; MARUYAMA, S. A.; CLAUS, T.; MONTANHER, P. F.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V.; GOMES, S. T. M.; MATSUSHITA, M. Antioxidant activity of Brazilian bean cultivars. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 765-770, 2013.
- PEDROSA, M. M.; CUADRADO, C.; BURBANO, C.; MUZQUIZ, M.; CABELLOS, B.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; ASENSIO-VEGAS. Effects of industrial canning on the proximate composition, bioactive compounds contents and nutritional profile of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, London, v. 166, p. 68–75, 2015.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.
- RANILLA, L. G.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 13, p. 5734–5742, 2009.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- REHMAN, Z.; SALARIYA, A. M. The effects of hydrothermal processing on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 695–700, 2005.
- ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; IBARRA-PÉREZ, F. J.; NAVA-BERÚMEN, C. A.; GALLEGOS-INFANTE, J. A. Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 31–35, 2007a.
- ROCHA-GUZMÁN, N. E.; HERZOG, A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; IBARRA-PÉREZ, F. J.; ZAMBRANO-GALVÁN, G.; GALLEGOS-INFANTE, J. A. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, London, v. 103, p. 521-527, 2007b.
- SIAM, S.; WOOD, J. A.; AGBOOLA, S.; KONCZAK, I.; BLANCHARD, C. L. Effects of soaking, boiling and autoclaving on the phenolic contents and antioxidant activities of faba beans (*Vicia faba* L.) differing in seed coat colours. **Food Chemistry**, London, v. 142, p. 461–468, 2014.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SUÁREZ-MARTÍNEZ, S. E.; FERRIZ-MARTÍNEZ, R. A.; CAMPOS-VEGA, R.; ELTON-PUENTE, J. E.; CARBOT, K. T.; GARCÍA-GASCA, T. Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. **CYTA: Journal of Food**, Abingdon, v. 14, n. 1, p. 131–137, 2016.

- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.
- TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. **Food Chemistry**, London, v. 93, n. 4, p. 713–718, 2005.
- VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; JAGER, A.; JONGEN, W. M. F. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3606–3613, 2001.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 1, p. 1–13, 2008a.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 11, p. 4754–4764, 2009.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 3, p. 974–981, 2011.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. **Food Chemistry**, London, v. 134, n. 3, p. 1287–1296, 2012.
- XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Total phenolic content and antioxidant properties of Eclipse Black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 73, n. 2, p. 19–27, 2008b.
- ZHAO, Y.; DU, S.; WANG, H.; CAI, M. *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chemistry**, London, v. 152, p. 462–466, 2014.
- ZHAO, Y.; WANG, Y.; JIANG, Z.; LI, R. Screening and evaluation of active compounds in polyphenol mixtures by HPLC coupled with chemical methodology and its application. **Food Chemistry**, London, v. 227, p. 187–193, 2017.

4. BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO FEIJÃO COMUM: INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E DO PROCESSO DE DIGESTÃO *IN VITRO*

Resumo

Os feijões fazem parte da alimentação de muitas pessoas ao redor do mundo. Estes grãos são conhecidos por serem fonte de ferro e proteínas. Contêm também em sua composição, substâncias com potencial benéfico à saúde, os compostos fenólicos. O efeito de diferentes formas de processamento sobre o conteúdo de polifenóis encontrados nos feijões carioca (BRS Pérola) e preto (BRS Esteio) foi avaliado. A avaliação da bioacessibilidade dos polifenóis foi verificada através da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*. A identificação dos principais compostos fenólicos presentes nas amostras de feijão cru, cozido submetidas a diferentes tratamentos e nos digeridos de cada etapa do processo digestivo foram analisados por CLAE. O tratamento térmico foi eficaz na liberação de compostos que não estavam livres no grão cru, aumentando assim a concentração destes compostos no extrato de feijão cozido. Amostras com maior concentração de polifenóis não resultam necessariamente em alta bioacessibilidade, já que a estabilidade do composto e a forma como ele se encontra na matriz irão refletir no conteúdo bioacessível. No geral, a concentração dos polifenóis na fração bioacessível foi menor do que o conteúdo encontrado na amostra não digerida. Além disso, foi demonstrado que a forma de processamento térmico, a matriz, bem como o processo digestivo influenciam no conteúdo destes bioativos na fração bioacessível.

Palavras chave: Leguminosas; Cocção; Tratamento térmico; Compostos bioativos; Polifenóis; Biodisponibilidade; *Phaseolus vulgaris* L.

Abstract

Beans are part of the diet of many people around the world. These grains are known to be source of iron and protein. They also contain in their composition, substances with health potential, the phenolic compounds. The effect of different forms of processing on the content of polyphenols in carioca (BRS Pérola) and black (BRS Esteio) beans was evaluated. The bioaccessibility of polyphenols was assessed by simulation of *in vitro* gastrointestinal digestion. The identification of the main phenolic compounds in raw and cooked beans submitted to different treatments and in the digests of each stage of the digestive process were analyzed by HPLC. The heat treatment was effective in the release of compounds that were not free in the raw grain, thus increasing the concentration of these compounds in the cooked bean extract. Samples with a higher concentration of polyphenols do not necessarily result in high bioaccessibility, since the stability of the compound and the way it is in the matrix will reflect on the bioaccessible content. In general, the concentration of the polyphenols in the bioaccessible fraction was lower than the content found in the undigested sample. In addition, it was demonstrated that the thermal processing, the matrix, as well as the digestive process will influence the content of these bioactives in the bioaccessible fraction.

Keywords: Legumes; Cooking; Heat treatment; Bioactive compounds; Polyphenols; Bioavailability; *Phaseolus vulgaris* L.

4.1. Introdução

Nos últimos anos, o consumo de alimentos vegetais tem sido incentivado entre a população (FAO/WHO, 2003), isto porque, estudos científicos (GUTIÉRREZ-URIBE; ROMO-LOPEZ; SERNASALVADOR, 2011; MORENO-JIMÉNEZ et al., 2015; SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2016) mostram que estes alimentos podem contribuir com a saúde do consumidor. Entre os alimentos vegetais

amplamente consumidos estão as leguminosas, classe conhecida por ser fonte de proteína de baixo custo, principalmente para populações carentes (HAYAT et al., 2014). Entre os diversos tipos de leguminosas existentes destacam-se os feijões, grãos consumidos mundialmente nos mais diversos tipos de preparações culinárias. No Brasil, o feijão faz parte do cotidiano, pois compõe a base da alimentação dos brasileiros juntamente com o arroz.

Além de conter nutrientes essenciais, o feijão contém fitoquímicos que podem ter efeito benéfico à saúde. A principal classe de fitoquímicos investigada em feijões são os compostos fenólicos (ESPINOSA-ALONSO et al., 2006; LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006; MOJICA et al., 2015; PAJAK et al., 2014; ROSS; BETA; ARNTFIELD, 2009). Estas substâncias têm recebido atenção especial, pois estudos têm mostrado que os compostos fenólicos encontrados no feijão podem contribuir com a prevenção e/ou redução do risco de doenças crônicas como diabetes, câncer e dislipidemias (GUTIÉRREZ-URIBE; ROMO-LOPEZ; SERNA-SALDÍVAR, 2011; MOJICA et al., 2015; SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2016).

Os feijões precisam ser submetidos à cocção para posteriormente serem consumidos e existem diversas maneiras de preparar leguminosas, sendo que entre as mais comuns estão o cozimento por vapor, fervura, sob pressão, microondas e *sous vide*. Pode-se ainda realizar a maceração dos grãos, utilizada para diminuir o tempo de cocção (FABBRI e CROSBY, 2016). O tratamento térmico melhora a palatabilidade, textura e pode aumentar a biodisponibilidade de nutrientes. Entre os efeitos mais conhecidos do processo térmico estão a gelatinização do amido e a desnaturação proteica (MORENO-JIMÉNEZ et al., 2015). Porém, o tratamento térmico pode alterar os compostos fenólicos presentes nos alimentos (D ARCHIVIO et al., 2010). Em estudos sobre a influência do tratamento térmico realizados com feijão, são encontrados comportamentos controversos. Pedrosa et al. (2015) verificaram redução no conteúdo de compostos fenólicos em feijão submetido ao processamento industrial. Por outro lado, Huber et al. (2016) verificaram aumento na concentração de ácidos fenólicos e flavonoides identificados por CLAE em feijões marrons após cocção doméstica. Segundo Guillén et al. (2017) a forma de processamento afeta de modo distinto os compostos bioativos dos alimentos.

Desta forma, conhecer a composição química dos alimentos, bem como o comportamento de seus componentes após o processamento é de grande relevância, pois assim é possível melhorar a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos através da compreensão das modificações que ocorrem ao longo do processamento. Neste contexto, é importante ressaltar que nem todo conteúdo de polifenóis ingerido é absorvido e aproveitado pelo organismo humano, já que para estar biodisponível, os compostos bioativos precisam ser liberados da matriz alimentar e modificados no trato digestivo (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). A porção do nutriente ou composto bioativo que é liberada da matriz alimentar durante a digestão gastrointestinal e se torna disponível para absorção no intestino é conhecida como fração bioacessível (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; PARADA e AGUILERA, 2007). Sendo assim, do ponto de vista nutricional e funcional, é de suma importância conhecer a bioacessibilidade dos alimentos consumidos no dia a dia. Além disso, compreender a influência da matriz alimentar e do processamento nas possíveis interações e na estabilidade dos

compostos bioativos é primordial para compreender a atividade biológica destas substâncias (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015).

Apesar de ser um alimento amplamente e regularmente consumido, ainda há pouca informação sobre a bioacessibilidade de compostos fenólicos do feijão. Estudos foram realizados com grãos de feijão cozido (CHEN et al., 2015; LAPARRA; GLAHN; MILLER, 2008; NDERITU et al., 2013), extratos (CHIANG et al., 2014; SANCHO; PAVAN; PASTORE, 2015) e em pratos a base de feijão (Feijoada) (FALLER; FIALHO; LIU, 2012). Entretanto, estudos sobre a avaliação da influência da forma de processamento sobre a bioacessibilidade de compostos fenólicos em feijão são escassos (AKILLIOGLU e KARAKAYA, 2010; LUO et al., 2014), justificando a necessidade de realização do presente estudo.

Diante deste contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência de diferentes formas de processamento térmico e do processo digestivo simulado *in vitro* sobre a concentração e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos dos feijões carioca (BRS Pérola) e preto (BRS Esteio) (variedades mais consumidas no Brasil).

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Material

Para desenvolvimento do presente estudo foram utilizados feijões carioca (BRS Pérola) e preto (BRS Esteio), por serem os tipos mais consumidos no Brasil. Os grãos foram doados pela Embrapa Arroz e Feijão. As amostras de feijão foram colhidas no mês de setembro de 2015, no município de Hidrolândia – GO. O plantio foi realizado no sistema orgânico de produção, com irrigação por aspersor convencional, a plantação foi adubada com esterco de galinha. A colheita foi semimecanizada, com arranque manual e triagem mecanizada. Após terem sido recebidas na ESALQ, Piracicaba – SP, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4°C) para melhor conservação.

4.2.2. Tratamentos e preparo de amostra

Os feijões foram analisados antes da cocção (T1), após maceração por 12 horas (T2), cozido em panela aberta com descarte da água de maceração (T3), cozido em panela aberta sem descarte da água de maceração (T4), cozido em panela de pressão com descarte da água de maceração (T5), cozido em panela de pressão sem descarte da água de maceração (T6).

O tratamento T2 consistiu na imersão dos feijões em água destilada na proporção 1:3 (m/v) por 12 horas a temperatura ambiente. Os tratamentos T3 e T4 foram conduzidos em panela aberta de alumínio, em fogo baixo por 1 hora. Para T3 a proporção entre feijão e água destilada foi 1:14 (m/v) e para T4 1:10 (m/v). Os tratamentos T5 e T6 foram conduzidos em autoclave a 121°C, sob pressão de 1 atm (semelhante a panela de pressão doméstica) por 10 minutos. Para T5 a proporção entre feijão e água destilada foi de 1:2 (m/v) e para T6 foi utilizada apenas a água de maceração.

As amostras cruas (T1) foram armazenadas em temperatura de refrigeração (4°C) até o momento das análises, quando foram trituradas em moinho de facas (Marconi – modelo TE 345). Os grãos macerados (T2) e os cozidos foram homogeneizados com mixer para alimentos (Black & Decker – modelo SB40T), sendo utilizada a água de maceração e a água de cocção para homogeneização, respectivamente. Estas amostras foram submetidas à extração no mesmo dia de processamento, sendo as amostras cozidas homogeneizadas no máximo 2 horas após o cozimento.

As amostras de feijão cozido utilizadas na avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos foram preparadas e armazenadas a -26°C por aproximadamente 3 semanas, até o momento da digestão *in vitro*, quando foram descongeladas para utilização.

4.2.3. Extração dos compostos fenólicos

A extração de compostos fenólicos das amostras de feijão foi realizada de acordo com Ojwang, Dykes e Awika (2012) com modificações. Para extração dos compostos fenólicos foi utilizado metanol 70% com 1% de ácido acético. As amostras cruas e maceradas foram extraídas na proporção de 1:20 (m:v) e as cozidas 1:10 (m:v). Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação em mesa agitadora (Tecnal – TE - 1401) a temperatura ambiente (26°C) durante 30 min. Logo após foi realizada a centrifugação (Novatecnica – NT825), 3248 g durante 20 minutos, a 15°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em frascos âmbar em freezer a -26°C para posteriormente ser utilizado nas análises.

Para extração dos compostos fenólicos da fração bioacessível (sobrenadante obtido após a centrifugação do material submetido à digestão *in vitro*) foram necessárias algumas adaptações. Para extração foram utilizados 10 mL do digerido liofilizado (Liotop L101), sendo adicionados 7 mL de solução extratora. O conteúdo foi homogeneizado em vortex por 1 minuto e sonicado em banho de ultrassom (Unique – USC -1400) por 15 minutos. Em seguida foi realizada a centrifugação a 3248 g durante 30 minutos, a 15°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -26°C até o momento das análises.

4.2.4. Determinação da matéria seca

A determinação da quantidade de matéria seca presente nas amostras foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC (2006). Este dado foi utilizado para expressar os resultados em base seca.

4.2.5. Análise de compostos fenólicos por CLAE

Para avaliação de compostos fenólicos presentes no extrato de feijão, antes e após a digestão *in vitro*, foi realizada a separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia utilizada por He et al. (2011) com modificações. O cromatógrafo utilizado é o modelo Shimadzu 20A, equipado com sistema de bombeamento modelo LC-20AT, injetor automático de amostras modelo SIL-20AHT, forno de coluna modelo CTO-20A, comunicador modelo CBM-20A e detector UV (280 e 370 nm) modelo SPD-20A. A coluna Waters Spherisorb ODS2 (C18)

(4,6 x 250 mm, 5 µm) foi utilizada para a separação dos compostos, sendo, mantida a temperatura de 40 °C pelo forno da coluna. As fases móveis foram A (1% de ácido fórmico em solução aquosa) e B (100% de metanol), as quais foram eluídas em gradiente como descrito a seguir: solvente A 100-40% de 0 a 45 minutos, 40-0% em 5 minutos, e 0-100% em 10 minutos. Posteriormente, a fase A foi mantida em 100 % por mais 5 minutos. O fluxo utilizado foi de 0,7 mL.minuto⁻¹.

Os extratos foram concentrados com nitrogênio e posteriormente filtrados e injetados no sistema CLAE. Para a identificação e quantificação dos picos das amostras foram utilizadas soluções estoque (1 mg.mL⁻¹) de diferentes padrões comerciais de compostos fenólicos. Preparados individualmente e diluídos nas seguintes concentrações: 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/mL de ácido vanílico, 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/mL de ácido sinápico, 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/mL de ácido gálico, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/mL de ácido trans-ferúlico, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/mL de ácido p-cumárico, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/mL de catequina, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 µg/mL de epicatequina e 2,5; 5; 10; 25; 50 µg/mL de rutina. As soluções diluídas foram injetadas separadamente e em duplicata nas condições acima descritas. As áreas dos picos obtidas, bem como os tempos de retenção dos padrões, foram utilizados para a comparação, quantificação e identificação dos compostos fenólicos nas amostras posteriormente injetadas.

Estes compostos foram escolhidos, pois são os mais relevantes para feijão, conforme demonstrado em estudos anteriores (LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006; LIN et al., 2008; XU e CHANG, 2009; MOJICA et al., 2015).

4.2.6. Análise de compostos fenólicos totais (FT)

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando o método colorimétrico descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) com modificações. Para esta análise foram utilizados 200 µL de extrato, 1500 µL de água destilada e 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu, sendo a mistura foi agitada e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de 20% NaCO₃, a solução foi agitada e deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos antes da leitura. A absorbância foi medida a 765 nm (espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800). Para construção da curva de calibração, com 5 pontos, foi utilizado ácido gálico, com concentração variando de 0 a 0,08 mg/mL. O conteúdo total de fenólicos foi expresso como equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra em base seca.

4.2.7. Digestão *in vitro*

Para simulação do processo digestivo *in vitro* foi utilizada a metodologia de Thakkar et al. (2007) adaptada por Berni et al. (2014), com modificações de acordo com Tenore et al. (2013). As amostras de feijão cozido previamente homogeneizadas foram pesadas (10 g) e diluídas em 40 mL de solução de sais (KCL 0,37 g/L, NaCl 7,01 g/L, CaCl₂ 0,88 g/L). A mistura foi homogeneizada em um *vortex* e, em seguida, 10 mL foram recolhidos para iniciar o processo de digestão.

Neste estudo foram simuladas três principais etapas do processo digestivo humano: oral, gástrica e duodenal. Na etapa oral, foram adicionados 6 mL de solução base de saliva artificial (KCl

0,9 g/L, KSCN 0,2 g/L, NaH₂PO₄ 0,89 g/L, Na₂SO₄ 0,57 g/L, NaCl 0,3 g/L, NaOH 0,07 g/L) acrescida de 0,0045 g de ácido úrico (Amresco), 0,0633 g de α -amilase (A3176 - Type VI-B (≥ 10 unidades/mg de sólido) – Sigma), 0,0012 g de ureia (PA – Synth) e 0,15 mg de mucina (M3895 – Sigma) a cada uma das amostras. Em seguida, os tubos foram levados para estufa a 37°C e colocados em agitador Rocker (Labnet – Rocker 25) a 100 rpm por 10 minutos. Para simulação da etapa gástrica, os tubos tiveram os volumes ajustados para 30 mL com a solução de sais, e posteriormente, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1M. Adicionou-se 2 mL de solução de pepsina diluída (40mg/mL – P7000 (≥ 250 unidades/mg de sólido) – Sigma) em HCl 0,1M em cada amostra. O volume das amostras foi acertado para 40 mL com a solução de sais. Após estarem devidamente fechados, os tubos foram colocados sob agitação (Rocker-100 rpm) a 37°C por 2 horas. Finalizada a etapa gástrica, o pH das amostras foi ajustado para 6,0 com NaHCO₃ 1M, foram adicionados 3 mL de solução de bile (40 mg/mL – 5C-214601 – Sigma) e 2 mL de solução de pancreatina (10 mg/mL – P1750 (4 x USP specifications) – Sigma), ambas diluídas em NaHCO₃ 0,1M. O pH foi ajustado para 6,5 com NaHCO₃ 1M, o volume final foi ajustado para 50 mL com solução de sais e novamente as amostras foram encubadas a 37°C por 2 horas, sob agitação (Rocker-100 rpm).

Ao final de cada etapa da digestão foram retiradas amostras para verificar o comportamento dos compostos fenólicos nas diferentes etapas da digestão e também para avaliar, ao final do processo, a bioacessibilidade dos fenólicos. Finalizada a etapa ou o processo digestivo, as amostras digeridas foram centrifugadas (Novatecnica – NT825) a 2300 g a 4°C por 1 hora. O sobrenadante (fração bioacessível) foi coletado em novo tubo e armazenado em freezer a -26°C, por aproximadamente 10 dias, até o momento das análises.

A fim de evitar degradação dos compostos fenólicos por ação do O₂ (BERMÚDEZ-SOTO, TOMÁS-BARBERÁN, GARCÍA-CONESA, 2007) os tubos foram preenchidos com N₂ antes de seguirem para incubação em cada uma das etapas e também antes do armazenamento do material de análise.

A Figura 1 representada de forma resumida a simulação do processo digestivo *in vitro*.

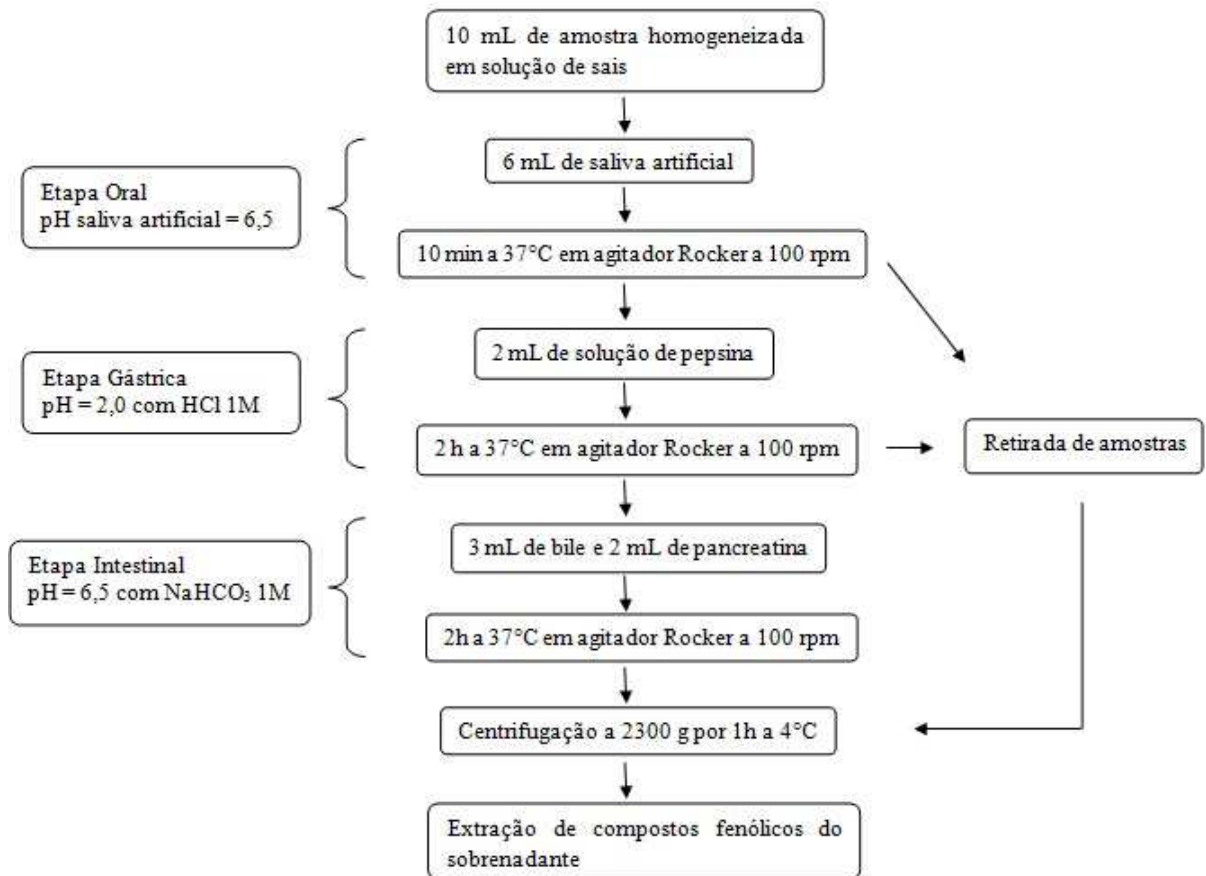


Figura 1. Fluxograma do processo de digestão *in vitro*.

4.2.8. Análise estatística

Neste experimento foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente aleatorizado, com 3 repetições para cada amostra. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) com verificação de todas as pressuposições e comparação de médias (Tukey) ao nível de significância de 5% e análise multivariada de perfil para o conteúdo de fenólicos totais, utilizando o sistema computacional SAS (Statistical Analysis System).

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada no software XLSTAT, considerando a matriz de correlação das médias das interações feijão, tratamento e etapa da digestão e das respostas físico-químicas (compostos fenólicos identificados por CLAE).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Efeito da forma de processamento sobre os compostos fenólicos

Os extratos de feijão cru apresentaram diversificado perfil de compostos fenólicos. No extrato de feijão carioca cru (T1) foram detectados apenas ácido vanílico e catequina, enquanto que, no extrato de feijão preto cru (T1) foram encontrados ácido sinápico, catequina e epicatequina (Tabelas 1 e 2). A literatura relata que a composição e o conteúdo de compostos fenólicos encontrados em feijões podem variar de acordo com o genótipo (MOJICA et al., 2015). Xu e Chang (2009) avaliaram feijões pretos e marrons (Pinto beans) e, encontraram, para ambos os feijões, diversos ácidos fenólicos, alguns dos quais também foram avaliados neste estudo, como os ácidos gálico, vanílico, sinápico, ferúlico e *p*-cumárico. Com relação aos flavonoides que coincidem com o presente estudo e foram identificados pelos autores estão: catequina e epicatequina, identificadas apenas no feijão preto. Como se pode verificar, os resultados encontrados por Xu e Chang (2009) diferem dos encontrados neste estudo, entretanto, como já foi dito o genótipo, além de fatores como clima e técnicas de cultivo (DUPONT et al., 2000; VAN DER SLUIS et al., 2001), têm influência no perfil de compostos fenólicos. Além disso, o método de extração utilizado também influenciará nos compostos encontrados no extrato (LAPARRA, GLAHN e MILLER, 2008; XU e CHANG, 2007).

Uma visão geral dos resultados permite verificar que, entre os flavonoides avaliados, o mais abundante e encontrado em todos os tratamentos, como já era esperado, foi a catequina (HUBER et al., 2016; KOSINSKA et al., 2011), para ambos os feijões. Entre os ácidos fenólicos pode-se notar que o ácido trans-ferúlico foi encontrado na maior parte dos tratamentos e nos dois tipos de feijão, sendo que maiores quantidades deste ácido foram encontradas no feijão preto. Luthria e Pastor-Corrales (2006) avaliaram 15 variedades de feijão comum e verificaram que o ácido ferúlico era um dos ácidos fenólicos mais abundantes, presentes em todas as variedades de feijão estudadas. Embora seja relatada na literatura a presença de ácido *p*-cumárico em feijões (MORENO-JIMÉNEZ et al., 2015; RANILLA, GENOVESE e LAJOLO, 2009; XU e CHANG, 2009), neste estudo não foi detectada a presença deste ácido fenólico em nenhuma das amostras. Isto pode estar relacionado, conforme já mencionado, às variedades de feijão estudadas, condições de plantio e também ao método de extração utilizado (DUPONT et al., 2000; LAPARRA, GLAHN e MILLER, 2008; MOJICA et al., 2015; VAN DER SLUIS et al., 2001).

Tabela 1. Concentração de ácidos fenólicos identificados por CLAE nos feijões carioca e preto sob diferentes formas de processamento.

Tratamento	Ácido Gálico ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)		Ácido Sinápico ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)		Ácido trans-ferúlico ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)		Ácido Vanílico ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base amostra seca)	
	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)
T1	ND	ND	ND	$37,50 \pm 3,88^d$	TR	ND	$19,21 \pm 1,75^a$	ND
T2	ND	ND	ND	$113,13 \pm 6,88^a$	ND	$43,64 \pm 2,75^a$	TR	ND
T3	ND	$31,77 \pm 1,23^c$	ND	$66,80 \pm 1,54^c$	$9,27 \pm 0,39^{bA}$	$11,71 \pm 0,21^{dA}$	$17,10 \pm 0,80^b$	ND
T4	ND	$44,64 \pm 3,99^b$	ND	$110,74 \pm 10,39^a$	$9,48 \pm 0,95^{bB}$	$30,88 \pm 2,28^{bA}$	TR	ND
T5	ND	ND	ND	$46,81 \pm 0,32^d$	$15,49 \pm 0,30^{aB}$	$23,85 \pm 0,53^{cA}$	TR	ND
T6	ND	$48,79 \pm 3,72^a$	ND	$100,39 \pm 1,16^b$	$17,71 \pm 1,05^{aB}$	$34,83 \pm 4,64^{bA}$	TR	ND

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n=3. Letras minúsculas diferentes nas colunas (entre os tratamentos) ou letras maiúsculas diferentes nas linhas (entre os tipos de feijão) diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. T1= feijão *in natura*, T2= feijão macerado por 12 horas analisado com a água de maceração, T3= cocção em panela aberta sem adição da água de maceração, T4= cocção em panela aberta com adição da água de maceração, T5= cocção sob pressão sem adição da água de maceração, T6= cocção sob pressão com adição da água de maceração. ND = não detectado; TR = traços.

Tabela 2. Concentração de flavonoides identificados por CLAE nos feijões carioca e preto sob diferentes formas de processamento

Tratamento	Catequina ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)		Epicatequina ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)		Rutina ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)	
	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)	Feijão Carioca (Pérola)	Feijão Preto (Esteio)
T1	$307,23 \pm 15,22^{bcB}$	$349,24 \pm 17,83^{cdA}$	ND	$20,00 \pm 0,27^d$	ND	ND
T2	$291,13 \pm 6,20^{bcB}$	$394,63 \pm 15,14^{cA}$	ND	TR	ND	TR
T3	$250,59 \pm 4,49^{cA}$	$258,32 \pm 1,95^{eA}$	$20,77 \pm 1,40^{aB}$	$47,24 \pm 0,87^{cA}$	ND	$13,55 \pm 0,34^b$
T4	$389,73 \pm 39,71^{aB}$	$457,88 \pm 51,56^{bA}$	$23,82 \pm 1,70^{aB}$	$58,21 \pm 7,18^{abA}$	ND	$25,35 \pm 2,60^a$
T5	$308,92 \pm 5,11^{bA}$	$325,43 \pm 4,81^{dA}$	ND	$52,68 \pm 2,38^{bc}$	ND	TR
T6	$379,65 \pm 20,09^{aB}$	$516,39 \pm 28,54^{aA}$	$26,28 \pm 1,88^{aB}$	$62,23 \pm 3,41^{aA}$	ND	$26,07 \pm 3,28^a$

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n=3. Letras minúsculas diferentes nas colunas (entre os tratamentos) ou letras maiúsculas diferentes nas linhas (entre os tipos de feijão) diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. T1= feijão *in natura*, T2= feijão macerado por 12 horas analisado com a água de maceração, T3= cocção em panela aberta sem adição da água de maceração, T4= cocção em panela aberta com adição da água de maceração, T5= cocção sob pressão sem adição da água de maceração, T6= cocção sob pressão com adição da água de maceração. ND = não detectado; TR = traços.

Para o feijão carioca, em todos os tratamentos, não foi encontrada a presença de ácido gálico. Mojica et al. (2015) avaliaram a composição fenólica de 12 variedades de feijão cru por LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas) e, entre estas variedades estava a cultivar Pérola (mesma utilizada neste estudo). Estes autores também não identificaram a presença de ácido gálico neste feijão. Em contrapartida, no caso do feijão preto, este ácido fenólico foi encontrado nos tratamentos T3, T4 e T6, mostrando que o processo de cocção utilizado auxiliou na liberação deste ácido da matriz alimentar. Maior concentração foi encontrada nos tratamentos em que a água de maceração foi utilizada para cocção (T4 e T6), sendo que o processo sob pressão (T6) conservou maior quantidade deste composto. Estas observações estão de acordo com o que foi reportado por Xu e Chang (2008b) que em seu estudo verificaram que o processamento térmico conduzido sob pressão conserva melhor o conteúdo de compostos bioativos em feijão. Huber et al. (2016) encontraram quantidades elevadas de ácido gálico em feijão marrom. Estes autores mostraram que o processo de cocção pode aumentar o conteúdo de ácido gálico livre, além disso, a cocção de grãos macerados sem a utilização da água de maceração resultou em redução no conteúdo de ácido gálico em comparação aos grãos cozidos sem maceração. Xu e Chang (2009) encontraram quantidades significativas de ácido gálico em feijões pretos crus. Nos grãos processados foi verificada redução no conteúdo de ácido gálico nos tratamentos de fervura e vaporização a pressão atmosférica, entretanto, o tratamento com utilização de vapor sob pressão possibilitou aumento na concentração de ácido gálico livre.

Ácido sinápico foi encontrado apenas no feijão preto, sendo que, de acordo com os resultados obtidos, o processo de maceração auxiliou na liberação de maior conteúdo deste ácido em relação ao grão cru. A maceração, além de promover o amaciamento do grão e facilitar o processo de cocção (LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006) possibilitou o início do processo germinativo, o que, por sua vez, promove modificações no perfil de polifenóis, qualitativa e quantitativamente. Além disso, a literatura relata que o processo de germinação ativa enzimas endógenas que podem atuar na liberação de compostos fenólicos que se encontram ligados a constituintes da matriz alimentar (LÓPEZ-AMORÓS, HERNÁNDEZ e ESTRELLA, 2006). Estudos mostram que o processo germinativo auxilia no aumento de alguns compostos fenólicos em leguminosas como feijão e tremoço (DUEÑAS et al., 2009; LÓPEZ et al., 2013). O feijão preto cozido mostrou ser boa fonte de ácido sinápico, sendo que o processo de cocção em panela aberta (T3 e T4) proporcionou maior conservação do conteúdo deste ácido do que o processo de cocção sob pressão (T5 e T6). Resultado semelhante foi encontrado por Xu e Chang (2009) para feijão preto, que apresentou maior concentração de ácido sinápico em cocção por fervura a pressão atmosférica (19,66 µg/ g amostra em base seca) do que sob pressão (8,65 µg/ g amostra em base seca). Novamente, a utilização da água de maceração para o cozimento aumentou significativamente a concentração do composto fenólico, já que, desta maneira, parte do conteúdo não é descartado com a água de maceração. Huber et al. (2014) relatou resultado semelhante para ácido sinápico em feijão branco, pois segundo os autores o conteúdo deste ácido fenólico aumentou após o processamento térmico. Além disso, quando o grão foi cozido sem a água de maceração a concentração de ácido sinápico foi menor que o grão cozido não macerado.

Entre os ácidos fenólicos avaliados, o ácido trans-ferúlico foi encontrado tanto nas amostras de feijão carioca como nas de feijão preto, estando distribuído nos tratamentos de cocção avaliados e também nas variedades de feijão estudadas. O processo de maceração, bem como o processo de cocção mostraram-se importantes para a liberação de ácido trans-ferúlico livre. A cocção sob pressão proporcionou maior preservação do conteúdo de trans-ferúlico nos dois feijões. Estudos sobre o conteúdo fenólico de diversas variedades de feijão relatam que o ácido ferúlico é o mais abundante ácido fenólico encontrado em feijões (ESPINOSA-ALONSO et al., 2006; LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006). Laparra, Glahn e Miller (2008) encontraram ácido ferúlico em feijões branco, vermelhos e pretos cozidos, sendo que estes últimos apresentaram maiores concentrações deste fenólico, similarmente ao resultado encontrado no presente estudo. Moreno-Jiménez et al. (2015) verificaram comportamento semelhante ao encontrado neste estudo, onde o ácido ferúlico foi identificado apenas nas formas processadas de feijão Pinto Saltillo, Black 8025 e Bayo Victoria (variedades consumidas no México). Ranilla, Genovese e Lajolo (2009) explicam que o aumento na concentração deste composto após o processamento pode estar relacionada à hidrólise de ácidos hidroxicinâmicos conjugados, o que resulta na liberação de ácidos fenólicos livres.

Ácido vanílico foi encontrado em pequenas quantidades no feijão carioca cru (T1) e no T3, e nos demais tratamentos apenas traços deste elemento foram encontrados. Ao contrário do que ocorreu para os demais ácidos fenólicos, o processamento térmico não foi capaz de aumentar o conteúdo de ácido vanílico livre. No caso do feijão preto, este ácido não foi detectado. Mojica et al. (2015) encontraram ácido vanílico em pequenas concentrações para feijão tipo Pérola cru. Díaz-Batalla et al. (2006) identificaram pequenas quantidades de ácido vanílico em feijões marrons consumidos no México, os quais também verificaram redução na concentração deste ácido fenólico após a cocção sob pressão.

Entre os flavonoides avaliados, catequina foi detectada em altas concentrações para ambos os feijões em todos os tratamentos, comportamento já era esperado, visto que este flavonoide é um dos mais representativos para leguminosas (HUBER et al., 2016; KOSINSKA et al., 2011). O conteúdo de catequina encontrado nas amostras cruas e maceradas não diferiu significativamente, sendo assim, para este composto fenólico a maceração não teve papel relevante. O tratamento térmico mostrou-se capaz de aumentar a liberação de catequina da matriz, além disso, a utilização da água de maceração para cocção aumentou significativamente o conteúdo de catequina livre. Granito, Brito e Torres (2007) explicam que os compostos fenólicos podem estar ligados a grupos amino ou esterificados com glicosídeos e o tratamento térmico pode hidrolisar estas ligações químicas, podendo levar ao aumento no conteúdo de fenóis do vegetal. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com o estudo de Huber et al. (2016) que também verificaram aumento no conteúdo de catequina após a cocção de feijões marrons. Além disso, estes autores mostraram que o grão macerado cozido sem a utilização da água de maceração tem menor conteúdo deste flavonoide do que o grão cozido sem maceração e, isto provavelmente se deve à solubilização da catequina no meio de maceração. Xu e Chang (2009) identificaram catequina em feijão preto, porém em quantidades inferiores (103,5 – 296,2 µg/g de amostra em base seca) às encontradas no presente trabalho (Tabela 2). Além disso, verificaram que entre os tratamentos avaliados, o processamento

com utilização de vapor sob pressão foi capaz de aumentar o conteúdo de catequina livre em relação à amostra crua.

Epicatequina foi encontrada nos dois tipos de feijão após a cocção, sendo que para o feijão carioca as diferentes formas de processamento não resultaram em valores diferentes entre si. Já no caso do feijão preto, a utilização da água de maceração para cocção dos grãos foi o fator determinante para o aumento no conteúdo de epicatequina livre. Em trabalho recente também foi identificada presença de epicatequina em feijão do tipo Pérola (MOJICA et al., 2015). Xu e Chang (2009) encontraram quantidades mais elevadas de epicatequina (177,9 – 294,1 µg/g de amostra em base seca) em feijão preto da variedade Turtle Eclipse do que as encontradas neste trabalho (20,0 – 62,2 µg/g de amostra em base seca) (Tabela 2).

Rutina ou quercetina-3-rutinosídeo foi encontrada apenas em feijão preto cozido, sendo que o descarte da água de maceração antes do cozimento mostrou reduzir significativamente o conteúdo deste flavonoide. Este flavonoide já foi identificado em feijão vermelho (Red kidney bean) (LIN et al., 2008) e em feijões consumidos na Espanha, da variedade Curruquilla (PEDROSA et al., 2015). López et al. (2013) identificaram rutina em feijões escuros após a germinação, demonstrando que o processo germinativo causa modificação no perfil fenólico do grão, além de modificar a quantidade de cada polifenol.

De maneira geral, o tratamento térmico possibilitou aumento no conteúdo dos compostos fenólicos que foram analisados por CLAE. A maceração mostrou ter papel relevante para alguns compostos como o ácido sinápico e o trans-ferúlico, aumentando seu conteúdo livre, porém esta resposta varia de acordo com o tipo de feijão. A cor dos feijões também está relacionada ao perfil fenólico encontrado nas cultivares, grãos com cores mais escuras, como o feijão preto, apresentam maior quantidade de flavonoides do que os grãos de cor clara (BENINGER e HOSFIELD, 2003). Moreno-Jiménez et al. (2015) já haviam relatado que o efeito do processo de cocção sobre os compostos bioativos é dependente da cultivar. Além disso, a desnaturação das proteínas durante o tratamento térmico pode promover a liberação de compostos bioativos que estavam ligados à matriz do grão. A utilização da água de maceração para cocção teve efeito significativo no aumento da concentração dos compostos fenólicos, isto porque, alguns compostos se solubilizam no meio de maceração, e o descarte desta água pode levar a perda destes bioativos (XU e CHANG, 2009).

A literatura relata que o conteúdo de polifenóis é afetado pelo tratamento térmico, seja causando aumento ou redução, dependendo do processo utilizado e do alimento em questão (FALLER e FIALHO, 2009; RANILLA, GENOVESE e LAJOLO, 2009; XU e CHANG, 2009). Então se pode concluir que o tratamento térmico promove tanto reações de decomposição de fenólicos, como transformações químicas, formando complexos (como fenol-proteína) (XU e CHANG, 2008a), e reações de hidrólise, que promovem a liberação de polifenóis ligados a macromoléculas (GRANITO, BRITO e TORRES, 2007). A estabilidade térmica de cada composto fenólico também vai refletir no seu comportamento após o tratamento térmico (BUNEA et al., 2008).

4.3.2. Influência da digestão *in vitro* e do processamento sobre a bioacessibilidade dos compostos fenólicos

No geral, pode-se notar que a concentração dos compostos fenólicos na fração bioacessível (obtida ao final da etapa intestinal) das amostras foi menor do que o conteúdo inicialmente detectado na amostra não digerida (Tabelas 3 e 4). Comportamento semelhante foi relatado em outros estudos de bioacessibilidade (KAMILOGLU et al., 2016; LAPARRA, GLAHN e MILLER, 2008; NDERITU et al., 2013; VALLEJO et al., 2004).

A maior parte dos ácidos fenólicos detectados nas amostras de feijão cozido não pôde ser observada ao final do processo digestivo, a exemplo podemos citar os ácidos gálico, sinápico e vanílico. Estes compostos podem ter sido degradados sob as condições da digestão ou a digestão enzimática não foi capaz de liberar os compostos da matriz alimentar (NDERITU et al., 2013). Há ainda a possibilidade de transformação destes ácidos em outros compostos (CHANDRASEKARA e SHAHIDI, 2012), o que não permitiria sua identificação pela técnica analítica utilizada.

O ácido trans-ferúlico, presente em todas as amostras de feijão cozido, foi detectado em menor concentração nas etapas oral e gástrica do que nas amostras não digeridas, nos dois tipos de feijão. Já na etapa duodenal, este ácido foi detectado apenas nas amostras de feijão preto submetidas aos tratamentos T3 e T4. Frente a estes resultados, pode-se dizer que a maior parte dos ácidos fenólicos encontrados nestes dois tipos de feijão não estava bioacessível, com exceção do ácido trans-ferúlico encontrado no feijão preto dos tratamentos T3 e T4. No caso do feijão preto, a cocção em panela aberta pode ter contribuído para a preservação deste ácido fenólico durante a digestão *in vitro*, possibilitando que este fosse encontrado na fração bioacessível. Laparra, Glahn e Miller (2008) detectaram ácido ferúlico na fração bioacessível de feijões comuns vermelhos e pretos em menor quantidade do que a extraída diretamente com metanol acidificado. Os feijões pretos apresentaram maior concentração de ácido ferúlico na fração bioacessível do que os feijões vermelhos. Nderitu et al. (2013) avaliaram o efeito da digestão simulada *in vitro* sobre os compostos fenólicos encontrados em feijão caupi provenientes do sul da África, (Agrinawa e Black-eye). De acordo com os resultados destes autores, o ácido ferúlico foi encontrado nas duas variedades após a cocção, porém, apenas a variedade Black-eye apresentou este ácido após a digestão *in vitro*, semelhantemente ao resultado encontrado no presente trabalho. Sendo assim, a bioacessibilidade do ácido ferúlico pode estar relacionada ao genótipo.

Tabela 3. Concentração de ácidos fenólicos identificados por CLAE durante a digestão *in vitro* dos feijões carioca e preto sob diferentes formas de processamento

Tipo de Feijão	Tratamento	Não digerido	Oral	Gástrica	Duodenal
Ácido Gálico (µg/g de amostra em base seca)					
Carioca	T3	ND	ND	ND	ND
	T4	ND	ND	ND	ND
	T5	ND	ND	ND	ND
	T6	ND	ND	ND	ND
Preto	T3	31,77 ± 1,23 c	ND	ND	ND
	T4	44,64 ± 3,99 b	ND	ND	ND
	T5	ND	ND	ND	ND
	T6	48,79 ± 3,72 a	ND	ND	ND
Ácido Sinápico (µg/g de amostra em base seca)					
Carioca	T3	ND	ND	ND	ND
	T4	ND	ND	ND	ND
	T5	ND	ND	ND	ND
	T6	ND	ND	ND	ND
Preto	T3	66,80 ± 1,54 c	ND	ND	ND
	T4	110,74 ± 10,39 a	ND	ND	ND
	T5	46,81 ± 0,32 d	ND	ND	ND
	T6	100,39 ± 1,16 b	ND	ND	ND
Ácido Trans-ferúlico (µg/g de amostra em base seca)					
Carioca	T3	9,27 ± 0,39 e A	4,80 ± 0,19 cd B	3,68 ± 0,01 c B	ND
	T4	9,48 ± 0,95 e A	3,22 ± 0,23 d B	ND	ND
	T5	15,49 ± 0,30 d A	11,53 ± 0,50 b B	8,77 ± 0,31 b B	ND
	T6	17,71 ± 1,05 d A	7,51 ± 1,01 c B	7,16 ± 0,43 b B	ND
Preto	T3	11,71 ± 0,21 e A	4,93 ± 0,15 cd C	6,23 ± 0,30 bc BC	7,36 ± 0,55 b BC
	T4	30,88 ± 2,28 b A	4,67 ± 0,35 cd C	9,56 ± 2,11 b B	11,25 ± 3,16 a B
	T5	23,85 ± 0,53 c A	20,30 ± 0,25 a B	21,36 ± 2,14 a AB	ND
	T6	34,83 ± 4,64 a A	21,22 ± 0,94 a B	19,27 ± 1,86 a B	ND
Ácido Vanílico (µg/g de amostra em base seca)					
Carioca	T3	17,10 ± 0,80	ND	ND	ND
	T4	ND	ND	ND	ND
	T5	ND	ND	ND	ND
	T6	ND	ND	ND	ND
Preto	T3	ND	ND	ND	ND
	T4	ND	ND	ND	ND
	T5	ND	ND	ND	ND
	T6	ND	ND	ND	ND

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n=3. Letras minúsculas diferentes nas colunas ou letras maiúsculas diferentes nas linhas, para o mesmo ácido fenólico, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. T3= cocção em panela aberta sem adição da água de maceração, T4= cocção em panela aberta com adição da água de maceração, T5= cocção sob pressão sem adição da água de maceração, T6= cocção sob pressão com adição da água de maceração. ND = não detectado.

Tabela 4. Concentração de flavonoides identificados por CLAE durante a digestão *in vitro* dos feijões carioca e preto sob diferentes formas de processamento

Tipo de Feijão	Tratamento	Não digerido	Oral	Gástrica	Duodenal
Catequina ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)					
Carioca	T3	250,59 \pm 4,49 e A	169,20 \pm 0,80 d B	166,83 \pm 8,29 b B	93,82 \pm 7,70 d C
	T4	389,73 \pm 39,71 c A	225,88 \pm 26,78 bc B	186,77 \pm 9,16 b B	127,08 \pm 0,80 cd C
	T5	308,92 \pm 5,11 d A	188,30 \pm 5,12 cd B	180,77 \pm 2,26 b B	197,43 \pm 0,96 ab B
	T6	379,65 \pm 20,09 c A	215,82 \pm 6,69 bc B	184,96 \pm 15,87 b BC	160,36 \pm 3,42 bc C
Preto	T3	258,32 \pm 1,95 e A	229,28 \pm 28,92 bc A	231,71 \pm 6,18 a A	235,12 \pm 11,82 a A
	T4	457,88 \pm 51,56 b A	248,21 \pm 4,75 b B	249,63 \pm 14,87 a B	227,40 \pm 12,98 a B
	T5	325,43 \pm 4,81 d A	254,71 \pm 8,89 b B	253,34 \pm 8,55 a B	213,46 \pm 13,79 a B
	T6	516,39 \pm 28,54 a A	299,04 \pm 19,07 a B	244,17 \pm 16,40 a C	151,19 \pm 13,82 c D
Epicatequina ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)					
Carioca	T3	20,77 \pm 1,40 d A	25,36 \pm 1,12 e A	23,40 \pm 0,93 c A	26,00 \pm 4,31 c A
	T4	23,82 \pm 1,70 d D	76,23 \pm 7,69 b A	52,95 \pm 1,10 b C	65,47 \pm 5,63 ab B
	T5	ND	67,09 \pm 1,46 c A	49,38 \pm 1,46 b B	58,65 \pm 1,98 b A
	T6	26,28 \pm 1,88 d C	86,22 \pm 1,98 a A	65,80 \pm 3,05 a B	70,64 \pm 12,94 a B
Preto	T3	47,24 \pm 0,87 c A	5,31 \pm 1,66 f B	ND	ND
	T4	58,21 \pm 7,18 ab A	16,85 \pm 0,34 e B	10,88 \pm 1,04 d B	10,30 \pm 0,56 d B
	T5	52,68 \pm 2,38 bc A	23,22 \pm 2,16 e B	16,48 \pm 2,78 cd B	15,17 \pm 0,69 d B
	T6	62,23 \pm 3,41 a A	39,03 \pm 1,47 d B	19,01 \pm 1,55 cd C	11,21 \pm 1,24 d C
Rutina ($\mu\text{g/g}$ de amostra em base seca)					
Carioca	T3	ND	ND	ND	ND
	T4	ND	ND	ND	ND
	T5	ND	ND	ND	ND
	T6	ND	ND	ND	ND
Preto	T3	13,55 \pm 0,34 b A	3,57 \pm 0,92 c C	13,74 \pm 1,24 bc A	8,47 \pm 3,30 b B
	T4	25,35 \pm 2,60 a A	8,07 \pm 0,10 ab C	22,46 \pm 1,37 a A	15,57 \pm 2,72 a B
	T5	ND	5,29 \pm 1,03 b c B	12,85 \pm 0,54 c A	ND
	T6	26,07 \pm 3,28 a A	10,70 \pm 0,91 a C	16,59 \pm 2,14 b B	7,93 \pm 0,51 b C

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n=3. Letras minúsculas diferentes nas colunas ou letras maiúsculas diferentes nas linhas, para o mesmo flavonoide, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. T3= cocção em panela aberta sem adição da água de maceração, T4= cocção em panela aberta com adição da água de maceração, T5= cocção sob pressão sem adição da água de maceração, T6= cocção sob pressão com adição da água de maceração. ND = não detectado.

Entre os flavonoides detectados após a digestão *in vitro*, catequina estava presente em maior concentração na fração bioacessível, ou seja, ao final da digestão gastrointestinal, seguido da epicatequina e da rutina (Tabela 4). Resultados semelhantes foram encontrados para fração bioacessível de feijão Agrinawa, onde foram detectadas catequina, catequina glucosídeo e epicatequina (NDERITU et al., 2013). Em estudo recente com feijões, Chen et al. (2015) também verificaram que catequina estava presente em maior quantidade entre os compostos identificados após a digestão *in vitro*. De acordo com os resultados (Tabela 4), o conteúdo de catequina detectado

ao longo das etapas do processo digestivo sofreu redução, sendo que as menores concentrações deste flavonoide foram encontradas na etapa duodenal, com maior redução observada para o feijão carioca. O feijão preto submetido ao T3 não teve seu conteúdo de catequina alterado ao longo da simulação da digestão, mostrando que embora tivesse menor concentração de catequina entre as amostras não digeridas (T3 a T6), esse conteúdo era altamente bioacessível, 91% de bioacessibilidade, diferentemente do T6 que embora tivesse elevado teor inicial de catequina, seu conteúdo sofreu redução ao longo da digestão, e apenas 29% estava bioacessível. Essa diferença no comportamento da catequina durante o processo digestivo pode estar associada a forma como este composto se encontra na amostra, sendo que no T3 não foi utilizada a água de maceração para cocção, ou seja, os compostos solúveis (livres) foram descartados. Já no T6, onde foi utilizada a água de maceração, estavam presentes na amostra tanto fenólicos livres quanto os ligados à matriz. Uma possível explicação para este comportamento é que a catequina ligada a matriz é mais estável ao processo digestivo do que as moléculas livres que foram solubilizadas na água de maceração, Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán e García-Conesa (2007) sugeriram anteriormente que a interação com componentes da matriz alimentar pode influenciar e alterar a estabilidade durante a digestão.

O conteúdo de epicatequina encontrado para as amostras de feijão preto cozido ao longo da digestão *in vitro* foi menor em todas as etapas do que a quantidade encontrada na amostra não digerida, sendo que maior percentual de bioacessibilidade foi encontrado no T5 (28,8% de bioacessibilidade). Bouayed et al. (2012) detectaram epicatequina na etapa gástrica da simulação da digestão *in vitro* de maçãs, porém, o composto não foi encontrado na etapa duodenal. Estes autores sugerem que após a transição do meio ácido gástrico para o meio intestinal levemente alcalino, pode ocorrer a formação de compostos desconhecidos, provavelmente pela presença de ácidos biliares e pancreatina. Em contrapartida, o conteúdo de epicatequina encontrado nas amostras de feijão carioca (T4, T5 e T6) ao longo das etapas da digestão foram superiores aquelas encontradas na amostra não digerida. Este comportamento controverso entre as duas variedades de feijão pode estar relacionado à diferenças entre os genótipos, mas além deste fator, podemos sugerir que o comportamento verificado no feijão carioca pode estar relacionado à instabilidade de seus dímeros de procianidinas durante a etapa gástrica, na qual estas moléculas sofrem degradação formando epicatequina (ZHU et al., 2002). Embora não tenha sido avaliada a presença de dímeros de procianidinas no presente estudo, a presença de procianidinas em feijão do tipo Pérola (mesma variedade do presente estudo) foi verificada por Mojica et al. (2015). Além disso, as moléculas de catequina e epicatequina são instáveis nas condições encontradas no meio duodenal, já que Zhu et al. (2002) demonstraram que catequina pode se formar de epicatequina e epicatequina se formar a partir de catequina, nas condições encontradas no meio intestinal. Chen et al. (2015) também verificaram aumento na concentração de epicatequina ao final da simulação da digestão gastrointestinal com Cranberry beans Red Rider, entretanto, este composto não foi encontrado ao final da digestão com Nondarkening Cranberry beans, o que confirma a hipótese de que a variedade estudada irá influenciar nos compostos bioacessíveis.

Rutina foi detectada apenas nas amostras de feijão preto, sendo que sua concentração na fração bioacessível foi menor do que na amostra não digerida. Durante a etapa gástrica maior

conteúdo de rutina foi extraído dos feijões em relação à etapa oral, entretanto, esse conteúdo sofreu redução na etapa duodenal. Mesmo comportamento foi verificado por Tenore et al. (2013) em trabalho realizado com maçãs, os quais ressaltam que na etapa gástrica os polifenóis continuam a ser extraídos da matriz, além de apresentarem boa estabilidade no meio ácido gástrico. Nos alimentos, grande parte dos flavonoides é encontrada na forma glicosilada. Esta forma apresenta resistência à hidrólise no estômago podendo chegar intacta ao duodeno. Todavia, sabe-se que para serem absorvidos no duodeno, os polifenóis precisam estar na forma de agliconas, por isso as formas glicosiladas, como a rutina, precisam ser hidrolisadas pelas enzimas intestinais para então serem absorvidas (MANACH et al., 2004). Isso explica a redução na concentração de rutina na etapa duodenal, pois sua hidrólise pode ter gerado outro composto não detectado pela análise utilizada.

No que diz respeito às etapas da digestão, podemos dizer que, de modo geral, a extração dos polifenóis presentes no alimento inicia na etapa oral. Geralmente o conteúdo extraído nesta fase é menor do que o encontrado na amostra não digerida, mas tem sua importância, já que a mastigação (TENORE et al., 2015) e a ação da α -amilase podem permitir a liberação dos polifenóis ligados a matriz. Na etapa gástrica, os compostos que puderam ser detectados nas amostras de feijão digeridas mostraram comportamento diferente. O ácido trans-ferúlico, no geral, manteve sua concentração em relação à etapa oral, e apenas para alguns tratamentos (feijão preto - T3 e T4) foi verificado aumento na concentração. A catequina manteve sua concentração na etapa gástrica, sendo que redução mais pronunciada foi verificada no feijão preto – T6. Epicatequina apresentou redução na concentração na maior parte dos casos em relação à etapa oral. No caso da rutina, houve aumento na concentração durante a etapa gástrica. Este comportamento diferenciado indica que a estabilidade dos polifenóis à digestão está relacionada às suas propriedades físico-químicas, à interação com os constituintes do meio gástrico (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013), além da influência da forma de processamento aplicada. Ademais, as enzimas presentes no meio gástrico e o baixo pH podem promover a hidrólise de fenólicos ligados a carboidratos e proteínas da matriz, aumentando a concentração destes bioativos no meio (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013). A etapa duodenal marcou redução na concentração dos polifenóis detectados na maioria das amostras avaliadas. Em alguns tratamentos realizados foi possível manter o conteúdo extraído durante a etapa gástrica (Tabelas 3 e 4), porém, sabe-se que os polifenóis são sensíveis ao meio levemente alcalino encontrado na etapa duodenal, e por isso, uma parte destes compostos pode ser transformada em substâncias estruturalmente diferentes, com outras propriedades químicas (BERMÚDEZ-SOTO, TOMÁS-BARBERÁN e GARCÍA-CONESA, 2007).

A análise de componentes principais (Figura 2) representa a distribuição dos indivíduos (amostras) em relação aos vetores (compostos fenólicos). Esta representação proporciona uma visão geral do que foi abordado anteriormente sobre o estudo da bioacessibilidade, além de possibilitar a avaliação da correlação entre as observações e as variáveis. Os dois componentes principais (PC1 e PC2) explicam 70,84% da variação dos dados, sendo que o PC1 explica a maior parte desta variação (53,33%). Este primeiro componente está positivamente correlacionado com todos os compostos fenólicos identificados na análise cromatográfica, com exceção do ácido vanílico. Já PC2, estava positivamente correlacionado com os ácidos sinápico, gálico e epicatequina (Figura 2 (b)).

As amostras localizadas do lado direito do PC1 (Figura 2 (a)), principalmente amostras não digeridas ou pertencentes a etapa gástrica, apresentam maior concentração dos compostos fenólicos positivamente correlacionados com este componente, os ácidos fenólicos sinápico, gálico e ferúlico, além dos flavonoides, epicatequina, catequina e rutina. Por outro lado, as amostras localizadas na parte negativa do PC1 apresentaram menor concentração destes polifenóis, sendo que desse lado está localizada a maior parte das amostras obtidas ao final do processo digestivo (d – duodenal).

Em relação ao PC2, as amostras localizadas na parte superior deste componente (parte positiva), em especial amostras de feijão carioca das etapas gástrica e duodenal, além das amostras de feijão preto não digeridas, estão relacionadas a maior concentração de epicatequina, ácido sinápico e gálico. A localização das amostras de feijão preto não digeridas indica maior concentração dos ácidos sinápico e gálico. A parte negativa do PC2 está relacionada aos seguintes compostos: rutina, catequina, ácido vanílico e ferúlico. Nesta região estão localizadas as amostras das etapas oral, gástrica e duodenal de feijão preto, juntamente com as amostras não digeridas de feijão carioca. Isto indica que estas amostras apresentaram maior concentração dos compostos citados.

As observações da análise de componentes principais corroboram com o que foi verificado e relatado anteriormente na análise univariada.

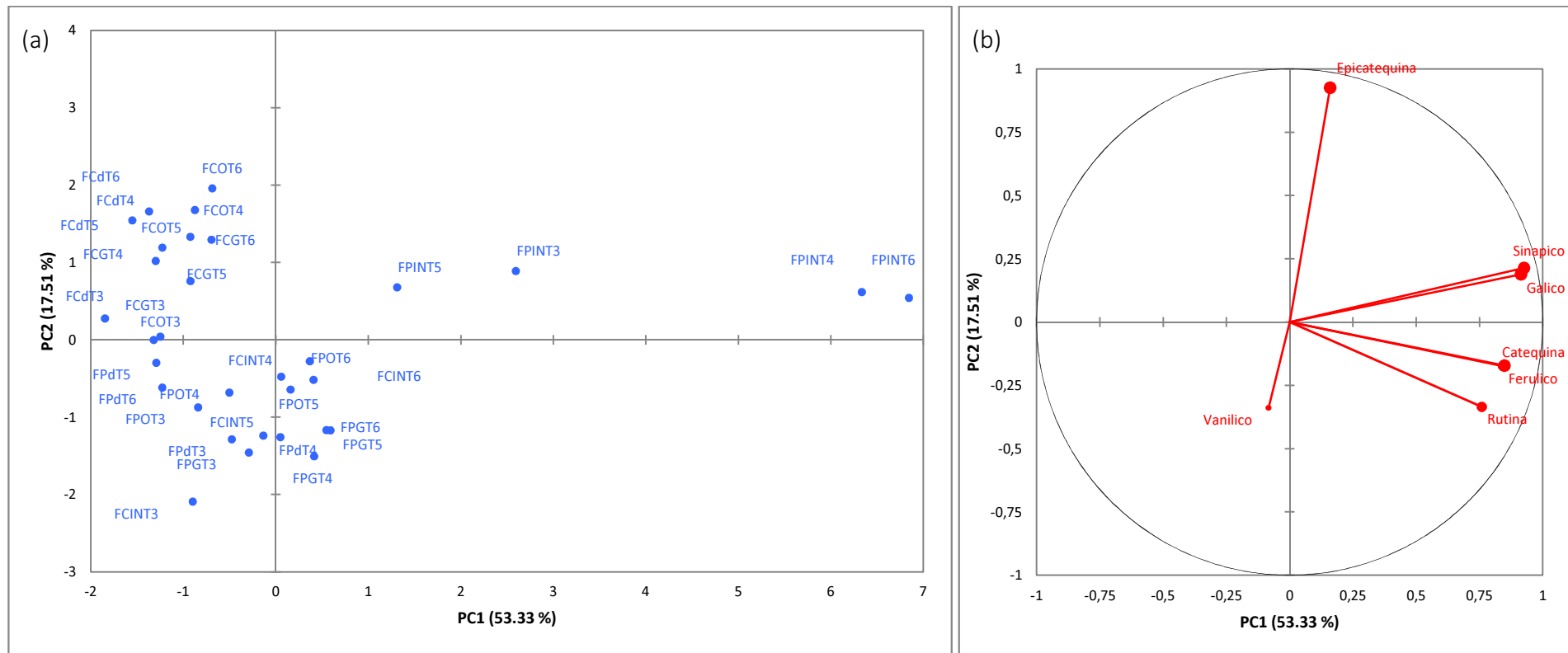


Figura 2. Análise de componentes principais (ACP) sobre a matriz de correlação dos feijões cozidos por diferentes tratamentos submetidos à digestão *in vitro* e das respostas físico-químicas. (a) representação das amostras; (b) representação dos compostos fenólicos. FP= feijão preto (BRS Esteio); FC= feijão carioca (BRS Pérola); T3= cocção em panela aberta sem adição da água de maceração, T4= cocção em panela aberta com adição da água de maceração, T5= cocção sob pressão sem adição da água de maceração, T6= cocção sob pressão com adição da água de maceração; IN= amostra não digerida; O= etapa oral; G= etapa gástrica; d= duodenal.

A representação gráfica da análise multivariada de perfil do conteúdo de fenólicos totais obtido para cada tratamento, tipo de feijão, ao longo das etapas do processo digestivo (Figura 3) permite observar que todos os perfis obtidos diferem entre si ($p < 0,05$), isso mostra que o tipo de feijão e a forma de processamento são fatores relevantes na avaliação da bioacessibilidade de polifenóis. Além disso, nota-se que embora as amostras tenham concentrações diferentes, o conteúdo de polifenóis extraído aumentou da etapa oral para gástrica e sofreu redução na etapa duodenal, tendência esta que foi verificada na maior parte dos compostos fenólicos identificados por CLAE, reforçando o comportamento observado. Através desta análise (Figura 3) é possível verificar que embora as diferentes formas de tratamento térmico tenham proporcionado diferente quantidade de polifenóis totais inicialmente (amostras não digeridas), nem todo esse conteúdo está bioacessível na maioria dos casos. Em especial para os tratamentos onde a água de maceração foi utilizada na cocção (T4 e T6) pode-se dizer que a fração bioacessível era menor do que nos tratamentos onde a água de maceração foi descartada, já que embora estivessem presentes em concentração elevada, a maior parte dos compostos fenólicos não estava na fração solúvel (menor concentração do que a amostra não digerida). Ao observar os tratamentos em panela aberta (T3 e T4) e sob pressão (T5 e T6) verificamos que estes dois estão bem divididos na Figura 3, mostrando que há diferença entre estas duas formas de cocção, ademais a cocção sob pressão possibilitou maior preservação dos compostos fenólicos bioacessíveis. Entre os tratamentos realizados sob pressão (T5 e T6), pode-se notar que a utilização da água de maceração não aumentou a concentração de polifenóis na fração bioacessível, considerando cada tipo de feijão separadamente.

A avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos totais em termos percentuais (Figura 4) confirma o que foi verificado anteriormente, a utilização da água de maceração na cocção não melhorou a bioacessibilidade dos polifenóis e, de modo geral, a cocção sob pressão proporcionou preservação de mais polifenóis na fração bioacessível. Sendo assim, a maceração seguida de cocção sob pressão, com descarte da água de maceração (T5) é recomendada, já que não interfere na bioacessibilidade dos compostos fenólicos e reduz os fatores antinutricionais, como os oligossacarídeos (KALPANADEVÍ e MOHAN, 2013).

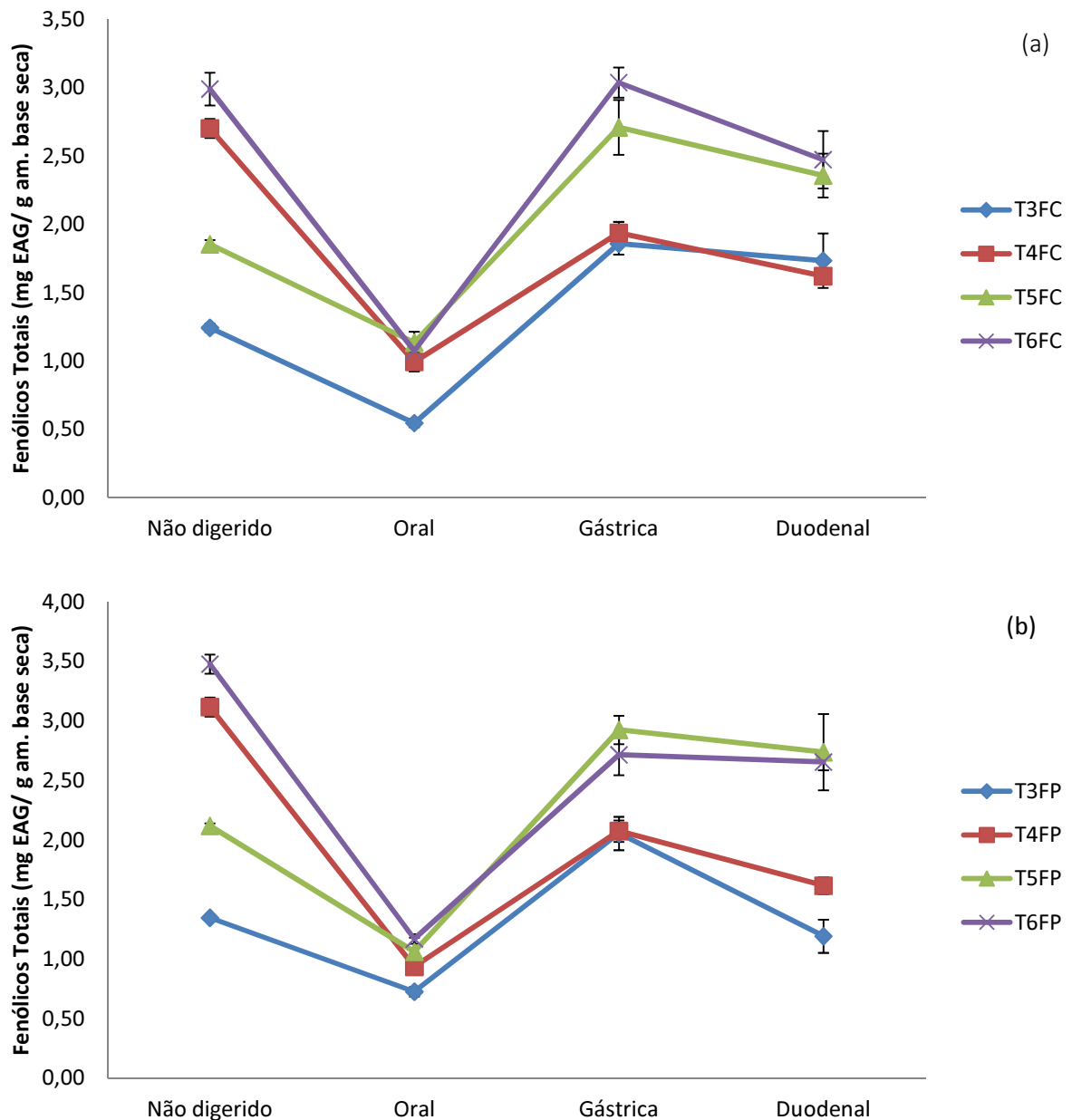


Figura 3. Conteúdo de fenólicos totais ao longo da digestão *in vitro* de acordo com tipo de feijão, (a) Carioca e (b) Preto, e tratamento.

Sancho, Pavan e Pastore (2015) avaliaram o efeito da digestão *in vitro* sobre os compostos fenólicos de extrato da casca de feijões vermelhos e pretos. Segundo eles, a digestão gastrointestinal reduziu o conteúdo de fenólicos totais em 75% no caso do feijão preto, e 52% para o feijão vermelho. Os autores atribuem essa redução à instabilidade dos polifenóis em pH elevado, como ocorre no meio intestinal. Akillioglu e Karakaya (2010) avaliaram a influência da maceração, da cocção e do processo de digestão *in vitro* sobre o conteúdo de fenólicos totais dos feijões comuns e “pinto beans” e, de acordo com estes autores, a maceração em água quente ou em água fria não causou diferença significativa na bioacessibilidade do polifenóis do feijão comum (29,4 % e 24,2% respectivamente), já no caso do feijão tipo “pinto beans” a maceração em água quente proporcionou maior

bioacessibilidade de polifenóis (25,5%) do que a utilização de água fria (19,8%). Os resultados encontrados por Sancho, Pavan e Pastore (2015) estão próximos aos encontrados no presente trabalho para alguns tratamentos utilizados (Figura 4), embora, no trabalho destes autores não tenham sido utilizados feijões cozidos. Por outro lado, o percentual de bioacessibilidade encontrado por Akillioglu e Karakaya (2010) está abaixo do que encontramos no presente estudo, e estas variações entre os resultados se devem aos diferentes métodos de digestão utilizados, diferentes método de maceração e cocção, além claro, da diferença nas matérias primas empregadas.

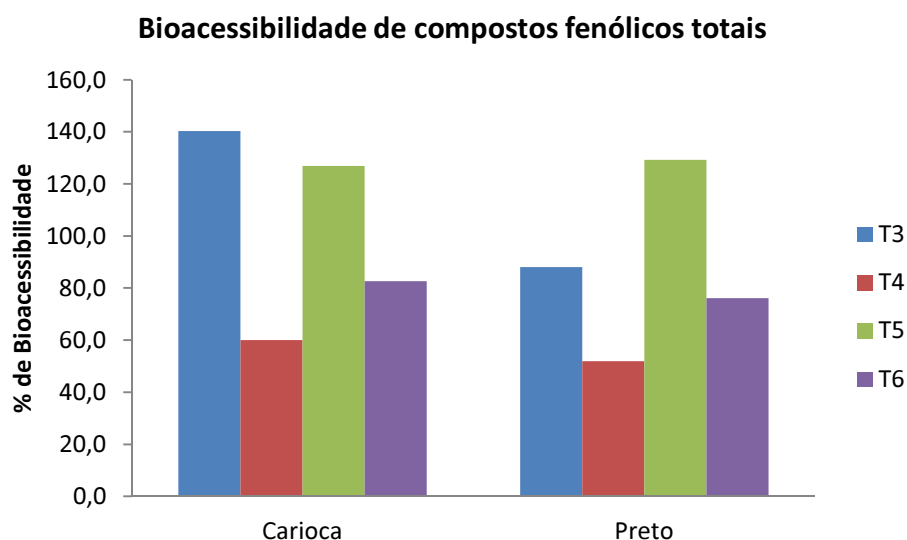


Figura 4. Percentual de bioacessibilidade de compostos fenólicos totais

A partir da observação dos resultados da simulação da digestão *in vitro* (Tabelas 3 e 4) pode-se dizer que os compostos identificados por CLAE neste estudo apresentam baixa bioacessibilidade, entretanto, isto não implica, necessariamente, em baixa biodisponibilidade destes compostos fenólicos, pois os polifenóis que se encontram ligados a matriz e as formas poliméricas que não foram absorvidas no duodeno podem ser liberadas no cólon por ação da microflora intestinal, podendo ser aproveitados pelo organismo (CHEN et al., 2015; MANACH et al., 2004). Chen et al. (2015) mostraram em seu estudo com feijões que as formas não bioacessíveis de polifenóis tem potencial para serem liberadas no intestino grosso durante a fermentação colônica. Segundo Saura-Calixto, Serrano e Goñi (2007), em frutas e leguminosas, a maior parte dos polifenóis está associada a fração não digerível que contém taninos condensados e polifenóis hidrolisáveis.

4.4. Conclusão

As diferentes formas de tratamento térmico avaliadas neste estudo possibilitaram maior extração de ácidos fenólicos e flavonoides encontrados nos feijões carioca e preto, quando comparado ao grão cru. A etapa de maceração, bem como a utilização da água de maceração para a cocção foram relevantes no aumento da concentração dos polifenóis após o tratamento térmico. A

utilização de pressão durante o cozimento permitiu melhor conservação dos polifenóis do que a cocção a pressão atmosférica. Todavia o estudo de bioacessibilidade mostrou que nem sempre maiores concentrações de polifenóis no alimento implicam em elevada bioacessibilidade, reforçando a importância dos estudos de bioacessibilidade, já que a determinação do conteúdo presente nos alimentos pode superestimar a quantidade realmente disponível para utilização no organismo. Embora a utilização da água de maceração na cocção tenha aumentado significativamente a concentração dos polifenóis após o tratamento térmico, esta prática não apresentou bons resultados na avaliação de bioacessibilidade dos polifenóis. O feijão preto apresentou maior bioacessibilidade dos compostos identificados por CLAE do que o feijão carioca. Os resultados deste estudo permitem inferir que a matriz alimentar, a forma de processamento e o processo digestivo irão influenciar na bioacessibilidade dos polifenóis, já que estes fatores interferem na estabilidade dos compostos. Entre as formas de processamento avaliadas, a cocção de grãos macerados sob pressão com descarte da água de maceração, apresentou melhores resultados no estudo de bioacessibilidade. Embora estudos *in vitro* não possam ser diretamente correlacionados aos acontecimentos *in vivo*, são muito úteis para avaliações da influência do processamento, da matriz alimentar e da digestão sobre os compostos de interesse, como a realizada neste estudo. São necessários mais estudos para investigar o papel da microflora colônica na bioacessibilidade de polifenóis que atingem o intestino grosso. Além disso, a utilização de outras técnicas cromatográficas, como LC-MS, pode permitir identificação de maior número de compostos presentes na fração bioacessível. A realização de estudos *in vivo* e *ex vivo* também é necessária para correlacionar as conclusões do estudo *in vitro* com as observações *in vivo* ou *ex vivo*.

Referências

- AKILLIOGLU, H. G.; KARAKAYA, S. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and *in vitro* digestion process. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 3, p. 633–639, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International 2006.
- BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 27, p. 7879–7883, 2003.
- BERMÚDEZ-SOTO, M.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA, M.-T. Food Chemistry Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, London, v. 102, p. 865–874, 2007.
- BERNI, P.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MOURA, F. M.; FAILLA, M. L. Impact of genotype and cooking style on the content, retention, and bioacessibility of β -carotene in biofortified cassava (*Manihot esculenta Crantz*) conventionally bred in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, n. 28, p. 6677–6686, 2014.

- BOUAYED, J.; DEUER, H.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. **Food Chemistry**, London, v. 131, n. 4, p. 1466–1472, 2012.
- BUNEA, A.; ANDJELKOVIC, M.; SOCACIU, C.; BOBIS, O.; NEACSU, M.; VERHÉ, R.; CAMP, J. V. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 2, p. 649–656, 2008.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BUNIOWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, Chicago, v. 13, p. 155-171, 2014.
- CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation. **Journal of Functional Foods**, London, v. 4, n. 1, p. 226–237, 2012.
- CHEN, P. X.; DUPUIS, J. H.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; LIU, R.; LIU, Q.; TANG, Y.; ZHANG, B.; RONG, T. Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of cooked regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 63, p. 10448–58, 2015.
- CHIANG, Y. C. CHEN, C. L.; JENG, T. L.; LIN, T. C.; SUNG, J. M. Bioavailability of cranberry bean hydroalcoholic extract and its inhibitory effect against starch hydrolysis following *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, Barking, v. 64, p. 939–945, 2014.
- D ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARÌ, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASSELLA, R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, p. 1321–1342, 2010.
- DÍAZ-BATALLA, L.; WIDHOLM, J. M.; FAHEY JR., G. C.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; PAREDES-LÓPEZ, O. Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 6, p. 2045–2052, 2006.
- DUEÑAS, M.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; FERNÁNDEZ, D. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). **Food Chemistry**, London, v. 117, n. 4, p. 599–607, 2009.
- DUPONT, M. S.; MONDIN, Z.; WILLIAMSON, G.; PRICE, K. R. Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3957–3964, 2000.
- ESPINOSA-ALONSO, L. G.; LYGIN, A.; WIDHOLM, J. M.; VALVERDE, M. E.; PAREDES-LOPEZ, O. Polyphenols in Wild and Weedy Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4436–4444, 2006.
- FABBRI, A. D. T.; CROSBY, G. A. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, Amsterdam, v. 3, p. 2–11, 2016.

- FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 1, p. 210–215, 2009.
- FALLER, A. L. K.; FIALHO, E.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of Feijoadá whole meal coupled with an *in vitro* digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 19, p. 4826–4832, 2012.
- FAO/WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva, 2003, 149 p.
- GRANITO, M.; BRITO, Y.; TORRES, A. Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus*. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 2801–2809, 2007.
- GUILLÉN, S.; MIR-BEL, J.; ORIA, R.; SALVADOR, M. L. Influence of cooking conditions on organoleptic and health-related properties of artichokes, green beans, broccoli and carrots. **Food Chemistry**, London, v. 217, p. 209–216, 2017.
- GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; ROMO-LOPEZ, I.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. **Journal of Functional Foods**, London, v. 3, n. 4, p. 290–297, 2011.
- HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton, v. 54, n. February 2013, p. 580–592, 2014.
- HE, L.; XU, H.; LIU, X.; HE, W.; YUAN, F.; HOU, Z.; GAO, Y. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC-ABTS⁺ assay. **Food Research International**, Barking, v. 44, p. 1161–1167, 2011.
- HUBER, K.; BRIGIDE, P.; BRETAS, E. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Effect of thermal processing and maceration on the antioxidant activity of white beans. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2014.
- HUBER, K.; BRIGIDE, P.; BRETAS, E. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Phenolic Acid, Flavonoids and Antioxidant Activity of Common Brown Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and After Cooking. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, Sunnysvale, v. 6, n. 5, 2016.
- KALPANADEVI, V.; MOHAN, V. R. Effect of processing on antinutrients and *in vitro* protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* (L.) Walp subsp. *unguiculata*. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 51, n. 2, p. 455–461, 2013.
- KAMILOGLU, S.; CAPANOGLU, E.; BILEN, F. D.; GONZALES, G. B.; GROOTAERT, C.; WIELE, T. V.; CAMP, J. V. Bioaccessibility of Polyphenols from Plant-Processing Byproducts of Black Carrot (*Daucus carota* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 64, n. 12, p. 2450–2458, 2016.
- KOSINSKA, A.; KARAMAC, M.; PENKACIK, K.; URBALWICZ, A.; AMAROWICZ, R. Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (*Vicia faba* Major) yield soluble and non-soluble complexes. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 233, n. 2, p. 213–222, 2011.

- LAPARRA, J. M.; GLAHN, R. P.; MILLER, D. D. Bioaccessibility of Phenols in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Iron (Fe) Availability to Caco-2 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 10999–11005, 2008.
- LIN, L.-Z.; HARNLY, J. M.; PASTOR-CORRALES, M. S.; LUTHRIA, D. L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food chemistry**, London, v. 107, n. 1, p. 399–410, 2008.
- LÓPEZ, A.; EL-NAGGAR, T.; DUEÑAS, M.; ORTEGA, T.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; PALOMINO, O. M.; CARRETERO, M. E. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, London, v. 138, n. 1, p. 547–555, 2013.
- LÓPEZ-AMORÓS, M. L.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 4, p. 277–283, 2006.
- LUO, Y.; XIE, W.; HAO, Z.; JIN, X.; WANG, Q. The impact of processing on *in vitro* bioactive compounds bioavailability and antioxidant activities in faba bean (*Vicia faba* L.) and azuki bean (*Vigna angularis* L.). **International Food Research Journal**, Serdang, v. 21, n. 3, p. 995–1001, 2014.
- LUTHRIA, D. L.; PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 2–3, p. 205–211, 2006.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, p. 727–747, 2004.
- MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, Barking, v. 69, p. 38–48, 2015.
- MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; CERVANTES-CARDOZA, V.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZALEZ-LAREDO, R. F.; ESTRELLA, I.; GARCIA-GASCA, T. J.; HERRERA-CARRERA, E.; DIAZ-RIVAS, J. O.; ROCHA-GUZMAN, N. E. Phenolic composition changes of processed common beans: Their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. **Food Research International**, Barking, v. 76, n. P1, p. 79–85, 2015.
- NDERITU, A. M.; DYKES, L.; AWIKA, J. M.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 3, p. 1763–1771, 2013.
- OJWANG, L. O.; DYKES, L.; AWIKA, J. M. Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Quadrupole Mass Spectrometry Profiling of Anthocyanins and Flavonols in Cowpea (*Vigna unguiculata*) of Varying Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 3735–3744, 2012.
- PAJĄK, P.; SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; ROZNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, London, v. 143, p. 300–306, 2014.

- PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 21–32, 2007.
- PEDROSA, M. M.; CUADRADO, C.; BURBANO, C.; MUZQUIZ, M.; CABELLOS, B.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; ASENSIO-VEGAS, C. Effects of industrial canning on the proximate composition, bioactive compounds contents and nutritional profile of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, London, v. 166, p. 68–75, 2015.
- RANILLA, L. G.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 13, p. 5734–5742, 2009.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAU, M. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 8, p. 1859–1867, 2013.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARÍN-BELLOSO, O. Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, London, v. 14, p. 33–43, 2015.
- ROSS, K. A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S. D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 1, p. 336–344, 2009.
- SANCHO, R. A. S.; PAVAN, V.; PASTORE, G. M. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. **Food Research International**, Barking, v. 76, n. P1, p. 74–78, 2015.
- SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 2, p. 492–501, 2007.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SUÁREZ-MARTÍNEZ, S. E.; FERRIZ-MARTÍNEZ, R. A.; CAMPOS-VEGA, R.; ELTON-PUENTE, J. E.; CARBOT, K. T.; GARCÍA-GASCA, T. Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. **CYTA: Journal of Food**, Abingdon, v. 14, n. 1, p. 131–137, 2016.
- TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; RITIENI, A.; NOVELLINO, E. *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 4, p. 3519–3524, 2013.
- TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; GIANNETTI, D.; NOVELLINO, E. Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols. **Food Chemistry**, London, v. 169, p. 320–326, 2015.
- THAKKAR, S. K.; MAZIYA-DIXON, B.; DIXON, A. G. O.; FAILLA, M. L. β -Carotene micellarization during *in vitro* digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in

- different genotypes of cassava. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 137, n. 10, p. 2229–2233, 2007.
- VALLEJO, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; PÉREZ-VICENTE, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. *In Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Broccoli Inflorescence Phenolic Compounds, Glucosinolates, and Vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 1, p. 135–138, 2004.
- VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; JAGER, A.; JONGEN, W. M. F. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar , Harvest Year , and Storage Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3606–3613, 2001.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 1, p. 1–13, 2008a.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 11, p. 4754–4764, 2009.
- XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 2, 2007.
- XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 73, n. 2, p. 19–27, 2008b.
- ZHU, Q. Y.; HOLT, R. R.; LAZARUS, S. A.; ENSUNSA, J. L.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H.; KEEN, C. L. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 6, p. 1700–1705, 2002.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os feijões carioca e preto cozidos mostraram ser fonte de compostos fenólicos, podendo ter maior concentração de polifenóis livres do que o grão cru, dependendo do tratamento térmico realizado. O feijão preto apresentou em sua composição maior diversidade de compostos fenólicos, em especial no grupo dos flavonoides, do que o carioca. A maceração mostrou ser relevante para liberação dos compostos fenólicos. A utilização da água de maceração para cocção aumentou significativamente a concentração de polifenóis e a atividade antioxidante em comparação às amostras onde a água de maceração foi descartada.

O estudo da bioacessibilidade revelou que elevada concentração de polifenóis no alimento não significa necessariamente elevada bioacessibilidade, já que as amostras que tinham maior concentração de polifenóis (com a presença da água de maceração para a cocção) apresentaram menor ou semelhante bioacessibilidade que as amostras onde a água de maceração foi descartada. Neste estudo ficou evidente que a forma de processamento térmico, a matriz alimentar e o processo digestivo irão influenciar na bioacessibilidade dos compostos fenólicos encontrados nos feijões.

A partir destes resultados reforçamos a importância dos estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade, já que o conteúdo de compostos bioativos ou nutrientes presentes nos alimentos não está integralmente disponível para absorção pelo organismo, refletindo diretamente nos seus efeitos benéficos à saúde do consumidor. Embora os compostos fenólicos identificados nas amostras estejam presentes em baixa concentração na fração bioacessível, aqueles compostos que não estão na fração solúvel podem atingir o cólon, onde estarão sujeitos a ação da microflora intestinal, podendo ser posteriormente absorvidos. Desta maneira, os compostos fenólicos encontrados nos feijões cozidos tem potencial para contribuir com a saúde dos consumidores. São necessários estudos sobre o papel da microflora na absorção dos compostos fenólicos que atingem o cólon, combinado com a utilização de técnicas cromatográficas mais avançadas, como a utilização do espectrômetro de massas. Além disso, para correlacionar os resultados obtidos nesta pesquisa com os eventos *in vivo*, são necessários experimentos *in vivo* e *ex vivo*.

ANEXO A – Certificado de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa
Email: ceap.esalq@usp.br

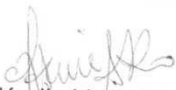
Fis. N°
Rub: 02

Protocolado: 2016.1.1559.11.4
Interessado: Solange Guidolin Canniatti Brazaca
Assunto: Certificado de Ética Ambiental na Pesquisa

CEAP – PARECER

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP) em reunião realizada em 21 de junho de 2016, aprovou por unanimidade a solicitação de Certificação da Prof.^a Solange Guidolin Canniatti Brazaca, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) pelo período de 21/06/2016 a 20/06/2019.

- 1 - Enc. ao LAN a/c da Prof.^a Solange Guidolin Canniatti Brazaca para ciência.
- 2 - Retorne a CEAP/SVAPESQ-11.


Prof. Dr. Cláudio Lima de Aguiar
Presidente da CEAP/ESALQ
27/06/2016