

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



TESE DE DOUTORADO

Perfil proteômico e parâmetros de qualidade tecnológica, nutricional e sensorial de feijão branco armazenado

Bianca Pio Ávila

Eng^a. Agrônoma

Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Pelotas, 2018

Bianca Pio Ávila

Perfil proteômico e parâmetros de qualidade tecnológica, nutricional e sensorial de feijão branco armazenado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof^a. Dr^a Márcia Arocha Gularte
Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111p Ávila, Bianca Pio

Perfil proteômico e parâmetros de qualidade tecnológica, nutricional e sensorial de feijão branco armazenado / Bianca Pio Ávila ; Márcia Arocha Gularte, Moacir Cardoso Elias, orientadores. — Pelotas, 2018.

117 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Faseolamina. 2. Gel bidimensional. 3. Vácuo. 4. Orgânico. I. Gularte, Márcia Arocha, orient. II. Elias, Moacir Cardoso, orient. III. Título.

CDD : 635.652

Elaborada por Dafne Silva de Freitas CRB: 10/2175

Bianca Pio Ávila

Perfil proteômico e parâmetros de qualidade tecnológica, nutricional e sensorial de feijão branco armazenado

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/05/2018

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Márcia Arocha Gularte (Orientadora), Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias (Orientador), Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a Dr^a Ana Paula do Sacramento Wally, Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Jander Luis Fernandes Monks, Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto, Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Ricardo Scherer Pohndorf, Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

Agradecimentos

À Deusa Deméter, Senhora dos Grãos, por me dar a inspiração e força em seguir o caminho sagrado do conhecimento, aprendendo e respeitando os grãos divinos, fonte de toda a vida.

Ao professor Moacir Cardoso Elias que ao me depositar confiança e oportunidade possibilitou-me a realização de um sonho, a conclusão da pós-graduação. Sua paixão pela agronomia é fonte constante de inspiração para nós que somos seus eternos alunos.

À professora Márcia Arocha Gularte, que com carinho, paciência, sabedoria e amizade foi compreensiva em todas as etapas do meu crescimento profissional. Suas orientações e exemplo como profissional serão sempre um estímulo em minha vida. Deixo aqui minha gratidão e admiração.

Ao professor Cesar Rombaldi que confiou em mim e não mediu esforços em ajudar para que essa pesquisa se concretizasse.

Ao professor Luciano Pinto pela disponibilidade do laboratório, pela atenção, orientações e momentos de descontração durante as análises. Um professor que inspira a paixão pela pesquisa.

Ao professor Jander Monks que sempre apoiou os experimentos e esteve disposto a ajudar.

Aos colegas do LabSensorial, Roberta, Estefânia, Mauro, Aline pelas palavras de apoio, pelas risadas, pelo café e doces que compartilhamos nos momentos difíceis e alegres da pós.

Aos colegas do Labgrãos, do Laboratório de Cromatografia, do Laboratório de Frutas e Hortaliças, ao IFSul, por fazer parte da minha caminhada acadêmica, a colega Gabriela Dutra Alves e aos colegas Luis Otávio e Lucas Ávila, futuros grandes profissionais que honram nossas instituições, pela amizade e carinho.

À colega Fabiana Ross Nora e Amilton Neto pela incansável disposição em ajudar, seus ensinamentos me deram coragem em acreditar que tudo ia dar certo.

À Patrícia da Rosa que, com paciência infinita, acabou fazendo parte da epopeia dos géis. E aos meus filhos de quatro patas que com todo o seu carinho foram capazes de apaziguar os momentos difícil, dando-me forças para nunca desistir.

Muito obrigada!!!

*“Lutarei pelos que não sabem, pelos que não podem,
pelos que não têm, para que um dia saibam, possam e tenham.”*

RESUMO

ÁVILA, Bianca Pio. **Perfil proteômico e parâmetros de qualidade tecnológica, nutricional e sensorial de feijão branco armazenado**. 2018. 117 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma fonte de proteínas, carboidratos complexos, vitaminas, ferro e cálcio para milhares de pessoas em todo o mundo. Além disso evidências experimentais comprovam a existência de uma proteína bloqueadora da enzima alfa-amilase, com efeitos emagrecedores e redução na glicemia e de grande ocorrência em feijões brancos, conhecida como faseolamina. Antes de ser consumido o feijão deve ser armazenado de forma segura, preservando assim a sua qualidade. Informações sobre as mudanças bioquímicas que ocorrem nos grãos durante o armazenamento são amplamente estudadas, no entanto, alterações detalhadas do perfil proteico são limitadas. Assim, o feijão branco cultivado em sistema orgânico, armazenado por um ano, com atmosfera modificada, variações de temperatura e com influência da luz foi estudado através das avaliações de parâmetros tecnológicos, nutricionais e sensoriais, além da comparação do perfil proteômico, obtido por eletroforese bidimensional. De todas as avaliações realizadas concluiu-se que o armazenamento à vácuo em ambiente refrigerado e protegido da luz retarda as alterações físico-químicas dos grãos, no entanto, após um ano, os grãos de feijão sofrem degradação/alteração de suas proteínas com expressiva redução do conteúdo de faseolamina e de proteínas expressivas no feijão.

Palavras-chave: Faseolamina; gel bidimensional; vácuo; orgânico.

ABSTRACT

ÁVILA, Bianca Pio. **Proteomic profile and parameters of technological, nutritional and sensorial quality of stored white beans.** 2018. 117 f. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) –Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a source of protein, complex carbohydrates, vitamins, iron and calcium for thousands of people around the world. In addition, experimental evidence supports the existence of an alpha-amylase enzyme blocker, which has a weight-loss effect and a reduction in glycemia and a high occurrence in white beans, known as phaseolamine. Before being consumed beans should be stored safely, thus preserving their quality. Information on biochemical changes occurring in grains during storage is widely studied, however, detailed changes in protein profile are limited. Thus, white beans cultivated in an organic system, stored for a year, with modified atmosphere, temperature variations and with influence of light were studied through evaluations of technological, nutritional and sensorial parameters, in addition to the comparison of the proteomic profile obtained by electrophoresis two-dimensional. From all the evaluations carried out, it was concluded that vacuum storage in a refrigerated environment protected from light delays physicochemical changes of the grains, however, after one year, the bean grains suffer degradation / alteration of their proteins with significant reduction of the phaseolamine content and of expressive proteins in beans.

Keywords: Phaseolamine; two-dimensional gel; vacuum; organic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema do escurecimento enzimático pela ação da polifenoloxidase.....	23
Figura 2. Ação da peroxidase sobre compostos fenólicos.....	23
Figura 3. Estrutura tridimensional da alfa-amilase pancreática humana.....	24
Figura 4. Relação estrutural dos oligossacarídeos da família rafinose.	28
Figura 5. Feijão Branco Chileno.	36
Figura 6. Sacos de polietileno metálico (a) e transparente (b).....	37
Figura 7. Fluxograma do delineamento das condições de armazenamento do feijão branco.....	39
Figura 8. Grãos de feijão contaminados com carunchos.....	51
Figura 9. Teor de umidade (%) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	52
Figura 10. Teor de proteína bruta (%) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	53
Figura 11. Luminosidade (L) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	55
Figura 12. Coordenada (a*) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	56
Figura 13. Coordenada (b*) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	57
Figura 14. Tempo de cocção dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	58
Figura 15. Coeficiente de hidratação dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	60
Figura 16. Inibição de alfa-amilase dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	62
Figura 17. Fenóis totais dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	63
Figura 18. Atividade de superóxido dismutase em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	66
Figura 19. Atividade de peroxidase em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	67
Figura 20. Atividade de polifenoloxidase em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	69
Figura 21. Taninos totais em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	71
Figura 22. Digestibilidade proteica (%) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	73
Figura 23. Ácido fítico em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.....	75

Figura 24. Inibição de tripsina (mg.g^{-1}) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	77
Figura 25. Rafinose (mg.g^{-1}) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	78
Figura 26. Estaquiose (mg.g^{-1}) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	79
Figura 27. Lignina (g.100g^{-1}) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.	81
Figura 28. Imagem de microscopia ótica de grãos de feijão branco armazenados por 12 meses.	83
Figura 29. Análise de componentes principais sobre a matriz de correlação dos atributos avaliados nos feijões armazenados por 12 meses em diferentes condições.	85
Figura 30. Descritores de caracterização dos feijões com tempo inicial de armazenamento.	87
Figura 31. Descritores de caracterização dos feijões armazenados por 12 meses em temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz.	87
Figura 32. Descritores de caracterização dos feijões armazenados por 12 meses em temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz.	88
Figura 33. Gel bidimensional de feijão branco com tempo inicial de armazenamento.	90
Figura 34. Gel bidimensional de feijão branco armazenado por 12 meses a 8°C com vácuo e sem presença de luz.	90
Figura 35. Gel bidimensional de feijão branco armazenado por 12 meses a temperatura ambiente sem vácuo e com presença de luz.	91
Figura 36. Mapa 2-DE de proteínas de feijão branco. Detalhes da identificação e propriedades das proteínas estão listadas na tabela 20.	103
Figura 37. Imagem 3D dos <i>spots</i> da alpha-phaseolin comparando os armazenamentos.	106
Figura 38. Imagem 3D dos <i>spots</i> de legumin comparando os armazenamentos.	107
Figura 39. Imagem 3D dos <i>spots</i> de alpha-amylase inhibitor comparando os armazenamentos.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento experimental para avaliar o efeito das condições e do tempo de armazenamento nas propriedades físico-químicas, nutricionais e sensoriais de feijão branco	40
Tabela 2. Delineamento experimental para análise sensorial e análise proteômica de feijão branco sob o efeito das condições e tempo de armazenamento	41
Tabela 3. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do teor de umidade	52
Tabela 4. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do teor de proteína bruta	54
Tabela 5. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da luminosidade	55
Tabela 6. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da coordenada a*	56
Tabela 7. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da coordenada b*	58
Tabela 8. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do tempo de cocção	59
Tabela 9. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do coeficiente de hidratação	61
Tabela 10. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da inibição da alfa-amilase	62
Tabela 11. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação dos fenóis totais	64
Tabela 12. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de superóxido dismutase	66
Tabela 13. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da atividade de peroxidase	67
Tabela 14. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da atividade de polifenoloxidase	69
Tabela 15. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de taninos totais	71
Tabela 16. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de digestibilidade proteica	73
Tabela 17. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de ácido fítico	75
Tabela 18. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da inibição de tripsina	77
Tabela 19. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da rafinose	78
Tabela 20. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da estaquiose	79

Tabela 21. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da lignina.....	82
Tabela 22. Matrix de correlação de Pearson para os atributos sensoriais dos grãos de feijão	86
Tabela 23. Médias ajustadas dos atributos que caracterizam as amostras de feijão branco.....	88
Tabela 24. Lista de proteínas diferencialmente expressas em feijão branco armazenados por 12 meses.....	93
Tabela 25. Média da abundância (% volume) das proteínas responsivas ao armazenamento por 12 meses em feijão branco	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Objetivos gerais.....	17
1.2. Objetivos específicos.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Importância e aspectos evolutivos da produção	18
2.2. O armazenamento do feijão.....	19
2.2.1. Armazenamento em atmosfera modificada	20
2.3. Aspectos nutricionais	21
2.4. Enzimas.....	21
2.5. Alfa-amilase	24
2.6. Inibição da alfa-amilase no feijão branco.....	25
2.7. Compostos bioativos	27
2.8. Carboidratos	27
2.8.1 Lignina.....	27
2.8.2. Oligossacarídeos da família rafinose	28
2.9. Fatores antinutricionais.....	29
2.9.1. Taninos.....	30
2.9.2. Ácido fítico.....	31
2.9.3. Digestibilidade de proteínas.....	31
2.9.4. Inibidores de protease	32
2.10. Análise sensorial.....	32
2.11. Proteoma.....	33
2.12. Eletroforese bidimensional	34
2.13. Identificação das proteínas <i>in silico</i>	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Amostras	36
3.2. Condições de armazenamento.....	36
3.3. Métodos.....	38
3.3.1. Delineamento	38
3.4. Caracterização dos grãos.....	41

3.4.1. Classificação do feijão.....	41
3.4.2. Peso de mil grãos.....	41
3.4.3. Dimensões	42
3.4.4. Teor de umidade e proteína bruta.....	42
3.5. Parâmetros de qualidade tecnológica dos grãos de feijão	42
3.5.1. Cor do tegumento.....	42
3.5.2. Tempo de cocção	42
3.5.3. Coeficiente de hidratação	42
3.6. Parâmetros nutricionais	43
3.6.1. Extração da faseolamina	43
3.6.2. Inibição da alfa-amilase	43
3.6.3. Fenóis totais	44
3.7. Atividade Enzimática.....	45
3.7.1. Superóxido dismutase	45
3.7.2. Atividade da peroxidase (PER).....	45
3.7.3. Atividade da polifenoloxidase (PFO)	46
3.8. Antinutricionais	46
3.8.1. Taninos totais	46
3.8.2. Digestibilidade proteica	46
3.8.3. Teor de ácido fítico.....	46
3.8.4. Inibição da tripsina.....	46
3.8.5. Oligossacarídeos.....	47
3.8.6. Lignina.....	47
3.9. Análise Sensorial	48
3.10. Análise proteômica	48
3.10.1. Extração das proteínas	48
3.10.3. Análise da integridade das proteínas	49
3.10.4. Eletroforese bidimensional	49
3.11. Análise estatística	50
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Caracterização os atributos físico químicos dos grãos	50
4.2. Parâmetros de qualidade tecnológica.....	54
4.3. Parâmetros nutricionais	61
4.4. Atividade enzimática	64
4.5. Antinutricionais	70
4.6. Análise Sensorial	84
4.7. Análise Proteômica	89

5. CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS	102

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um importante alimento em refeições da população mundial, sendo também parte da dieta básica do povo brasileiro. O Brasil juntamente com Índia, China, Myanmar, México e Estados Unidos concentra 60% da produção mundial desta fabacea, sendo também o maior consumidor (CONAB, 2017).

Segundo o levantamento da CONAB (2017), o Brasil produziu (compreendendo as três safras de feijão 2016/2017) 3,35 milhões de toneladas, sendo a região Centro-Sul (Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e São Paulo) a maior produtora, com 53,04% da produção total do país.

O feijão é um alimento básico que se destaca pela relevância nutricional, devido ao seu consumo diário. O feijão tem despertado crescente interesse como alimento funcional. As fabaceas contêm um número considerável de compostos bioativos, como os fenólicos, que estão associados a um efeito metabólico na prevenção de doenças e promoção da saúde para populações que consumirem esse alimento com frequência (KOBBLITZ, 2011).

Diversos estudos relatam uma variedade de produtos e extratos de origem natural, incluindo compostos isolados de plantas, que estão sendo utilizados no tratamento da perda de peso, assim como prevenindo a obesidade gerada por uma dieta rica em calorias (HAN, 2013).

Desde 1945, os inibidores de alfa-amilases começaram a ser mencionados na literatura científica. Segundo Bowman constatou-se a presença de um inibidor hidrossolúvel e termolábil nos feijões (BOWMAN, 1954). Em trabalho com o feijão branco, Marshale Lauda (1975), descreveram a purificação, bem como algumas propriedades físico-químicas do inibidor de alfa-amilase, denominada faseolamina. Essa proteína tem efeitos na inibição da digestão e absorção do amido e atua como complementadora de dietas para perda de peso e efeito hipoglicemiante em pacientes portadores de diabetes mellitus não-insulino dependentes (DM 2) (UDANI e SINGH 2007).

A faseolamina é uma proteína extraída da farinha de feijão branco, que por se tratar de um composto químico, sofre alterações durante o armazenamento

(OLIVEIRA, 2013), sendo imprescindível, portanto, o estudo para que se possa compreender e manter a qualidade dessa proteína.

Por isso, desvendar as interações bioquímicas dos grãos e associá-los às condições ambientais, métodos de processamento pós-colheita, genótipo, entre outros fatores, se torna tão importante. Uma das maneiras de avaliar a composição proteica dos grãos é por análise do perfil proteômico. A proteoma é uma área que permite a avaliação do conjunto de proteínas expressas num organismo, tecido ou células, num determinado momento fisiológico ou sob condições induzidas.

1.1. Objetivos gerais

Caracterizar o feijão comum classe branco (*Phaseolus vulgaris* L.) proveniente de sistema orgânico e avaliar o efeito das condições de armazenamento sobre as propriedades tecnológicas, nutricionais, sensoriais e a manutenção da qualidade proteica através da comparação do perfil proteômico.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o feijão comum classe branco orgânico;
- Verificar os efeitos da atmosfera modificada por vácuo, incidência de luz, regime de temperatura e do tempo de armazenamento do feijão já embalado, sobre os parâmetros físicos, químicos, tecnológicos e sensoriais;
- Extrair, purificar e quantificar o conteúdo de faseolamina na farinha de feijão branco;
- Identificar diferenças quantitativas das proteínas responsivas a esses diferentes tratamentos e armazenamento;
- Testar a proteômica como ferramenta para avaliação de alterações de parâmetros de qualidade em diferentes formas de armazenamento de grãos de feijão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância e aspectos evolutivos da produção

O feijão consumido no Brasil pertence à classe Dicotyledoneae, família Fabaceae, gênero *Phaseolus* e espécie, *Phaseolus vulgaris* L. O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas 5 são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P.lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P.polyanthus*, sua origem evolutiva e sua diversificação primária remetem as Américas (FREITAS, 2006).

A produção do gênero *Phaseolus* concentra-se nos Estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e São Paulo. Segundo o censo agropecuário da agricultura familiar (IBGE, 2015), aproximadamente 70% do feijão produzido no Brasil é proveniente da agricultura familiar. A produção mundial no ano de 2016, segundo dados da FAO foram em torno de 25 milhões de toneladas. Os sete principais países produtores de feijões secos e que juntos respondem por cerca de 64% da produção média mundial são: Índia e Mianmar (16%), Brasil (13%), EUA, México e Tanzânia (5%), e China (4%) (FAO, 2016).

A especialização da produção para atender ao mercado fez com que o agricultor familiar passasse a produzir para a comercialização em maior escala, além disso, é crescente a busca por alternativas como a redução dos custos de produção, a agregação de valor ao produto produzido, a substituição de insumos e a utilização de técnicas compatíveis com a preservação dos recursos disponíveis (DIDONET, 2009).

O mercado de alimentos orgânicos é um dos que mais cresce em âmbito mundial, em torno de 10 a 20 % ao ano, sendo que, a maior parte desses alimentos é exportada. O alimento orgânico trata-se do alimento produzido em sistemas que não utilizam agrotóxicos (inseticidas, herbicidas, fungicidas e nematicidas) e outros insumos artificiais tóxicos (adubos químicos altamente solúveis), organismos geneticamente modificados – OGM / transgênicos ou radiações ionizantes (DAROLT, 2002).

Esse mercado promissor tem atraído produtores principalmente do Sul do país, que mesmo com um valor de produto mais alto, atrai o consumidor que busca uma alimentação mais saudável. Produtos esses que abrangem frutas, hortaliças e grãos.

O feijão orgânico já é uma realidade no mercado e por se tratar um produto com alto valor agregado é necessário que sua vida de prateleira seja preservada com qualidade.

2.2. O armazenamento do feijão

A qualidade de cocção dos grãos de feijão está associada ao manejo pós-colheita e às condições de armazenamento (MOHAN et al., 2011). O armazenamento de feijão em condições desfavoráveis reduz a capacidade de absorção de água dos grãos durante a cocção, o que dificulta a separação celular, a gelatinização do amido e promove desnaturação proteica (YOUSIF et al., 2007).

Os consumidores são exigentes na seleção do feijão para o consumo, sendo a cor do tegumento fator limitante na determinação de preço para o comerciante e o consumidor. Feijões com o tegumento escuro não são escolhidos pelos consumidores, que associam o escurecimento ao tempo de armazenamento e ao endurecimento. Condições de armazenamento com alta umidade, temperatura e luminosidade, e longo período de armazenamento resultam em feijões escuros e endurecidos (MOHAN et al., 2011).

Em feijões que possuem tegumento de coloração clara, como os da classe Branco, são muito suscetíveis a essas alterações. A cor está associada à oxidação de compostos fenólicos presentes no tegumento e a textura às características da parede celular do grão, dentre as quais o grau de solubilidade dos polissacarídeos e a despolimerização durante o processo de cozimento são as mais importantes (BENINGER & HOSFIELD, 2003).

O emprego de embalagens tem o objetivo de prolongar a qualidade dos produtos. Os feijões destinados a alimentação são, comumente, comercializados em embalagens plásticas de polietileno e expostos à luz. A utilização da embalagem a vácuo e protegida da luz pode ser uma alternativa ainda mais eficiente na conservação do grão, por reduzir as reações de oxidação e que são prejudiciais para a sua qualidade, causando escurecimento, endurecimento e perdas nutricionais (LIMA, TOMÉ & ABREU, 2014).

Além da embalagem, o efeito conservador do frio apresenta-se como uma técnica promissora de manejo de grãos armazenados. Esse efeito baseia-se na inibição total ou parcial dos principais agentes responsáveis pela alteração dos

alimentos: o crescimento e a atividade dos micro-organismos, as atividades metabólicas dos tecidos vegetais após a colheita, as enzimas e as reações químicas. A aplicação do frio permite prolongar a vida útil dos alimentos durante períodos de tempo relativamente longos, com repercussão mínima nas suas características organolépticas (PERUSSELO et al., 2011).

Ordóñez (2005) explica que a velocidade das reações químicas e enzimáticas diminui em termos logarítmicos com a temperatura. Portanto, a refrigeração reduz a velocidade das reações químicas e enzimáticas, e permite controlar a perda de qualidade dos alimentos decorrentes de atividade fisiológica e de outras reações químicas: desnaturação de proteínas, oxidação de lipídeos, degradação de pigmentos e vitaminas, etc.

2.2.1. Armazenamento em atmosfera modificada

O armazenamento em atmosfera modificada é um dos procedimentos que tem ganhado destaque no estudo de vários alimentos. O armazenamento em embalagens consiste no acondicionamento do produto em uma embalagem selada e semipermeável a gases, a fim de reduzir a concentração de oxigênio e aumentar a de dióxido de carbono. A modificação da atmosfera é uma técnica de conservação utilizada para estender a vida pós-colheita e manter a qualidade de produtos vegetais (CROFT et al., 2016).

A escolha correta da embalagem, associada a um armazenamento sob condições favoráveis, minimiza perdas qualitativas e quantitativas, além de permitir maior flexibilidade na comercialização e agregar valor ao produto. Os materiais utilizados, além de protegerem os produtos contra danos, devem isolá-los de condições ambientais adversas, como temperatura, umidade e acúmulo de gases, (JUNK-KNIEVEL et al., 2007).

De maneira geral, os filmes plásticos são os mais utilizados e devem apresentar resistência mecânica à perfuração e à tensão, e características que permitam sua selagem térmica. O polietileno é o plástico mais popular do mundo. Pode ser utilizado em contato direto com alimentos, apresenta boa resistência química e provê excelente barreira à umidade (WARHAM, 2002).

A utilização da embalagem de polietileno metálica associada ao processo a vácuo pode prolongar a qualidade dos alimentos (OTLES & SAHYAR, 2016) devido à

pequena quantidade de oxigênio disponível no seu interior, e sua proteção contra a luz, pode auxiliar a redução da atividade de enzimas oxidativas e que são grandes responsáveis pelo escurecimento e o endurecimento do feijão.

2.3. Aspectos nutricionais

A qualidade nutricional dos grãos é de grande importância, uma vez que o feijão é consumido por todas as classes sociais, sendo para as de menor poder aquisitivo a principal fonte de proteínas, minerais, vitaminas e fibras. É considerado um alimento integral e seu consumo proporciona benefícios à saúde humana (BASSINELLO, 2009).

A proteína do feijão apresenta todos os aminoácidos requeridos pelo organismo humano, exceto os aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, em quantidades compatíveis com as necessidades nutricionais. O feijão apresenta teor elevado de lisina que exercem um efeito complementar com as proteínas dos cereais, ricos em aminoácidos sulfurados (RIOS et al., 2003). Na proporção de duas partes de arroz para uma parte de feijão, consegue-se a combinação dos aminoácidos em proporções adequadas ao atendimento das demandas humanas pelos aminoácidos essenciais (DOMENE, 2011).

Com relação às fibras contidas nos grãos, Goff et al. (2017) destacam seus reconhecidos efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, além do alto conteúdo de carboidratos complexos e da presença de vitaminas do complexo B. Há também o benefício do ferro com efeito antianêmico.

2.4. Enzimas

Atualmente, sabe-se que o estresse oxidativo desencadeando processos de escurecimento (cor) e endurecimento (textura) do grão de feijão são caracterizados por múltiplos mecanismos bioquímicos e, possivelmente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) seja o evento primário para desencadeá-los (KUMAR et al. 2018).

Segundo Kumar et al. (2018), os agentes oxidantes das ERO são resultantes de uma redução parcial do oxigênio molecular e que se distribuem em dois grupos, os radiculares: hidroxila (OH^\cdot), superóxido (O_2^\cdot), peroxila (ROO^\cdot) e alcóxila (RO^\cdot); e os não

radicais: oxigênio singleto (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar dos grãos recém-colhidos apresentarem baixas taxas metabólicas devido ao reduzido conteúdo de água, a oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e, dessa forma, a produção de radicais livres ocorrem naturalmente. Fatores como a deficiência hídrica, variações de luminosidade e temperatura, salinidade, injúrias provocadas por patógenos, uso de herbicidas, entre outros, podem intensificar a formação dessas espécies aumentando sua concentração no meio celular.

Os radicais superóxidos são os primeiros a serem formados, os quais não conseguem atravessar as membranas biológicas ficando confinados no compartimento onde foram gerados. Em seguida, haverá a formação da espécie peróxido de hidrogênio que tem a capacidade de atravessar as biomembranas e se distribuir a partir do local de sua produção. A última e mais reativa espécie a ser formada é o radical hidroxila ($OH\cdot$). Portanto todas essas espécies destacam-se pela grande reatividade com biomoléculas que, por consequência, provocam a lipoperoxidação das membranas celulares, bem como a oxidação de proteínas e quebra na cadeia do DNA (BROETTO et al., 2002). Um dos mecanismos que a célula dispõe para dismutar radicais livres produzidos em condição de estresse é a ativação de enzimas antioxidativas, dentre elas a superóxido dismutase e a catalase

A peroxidação de lipídios é um efetivo marcador bioquímico do estresse oxidativo, mediado pelas EROs, em tecidos de plantas lesionados ou sob algum tipo de estresse ambiental. A decomposição de ácidos graxos insaturados gera MDA (malonaldeído), o qual é o mais abundante produto aldeídico originado da quebra de lipídeos. A manutenção de baixos níveis de acúmulo de MDA tem sido mostrada estar associada com tolerância ao calor e radiação intensos. Ao contrário, altos níveis de MDA representam mais danos de membrana e menor tolerância aos estresses abióticos (ARA et al., 2013).

O escurecimento enzimático também pode estar relacionado à ação da peroxidase e da polifenoloxidase. A polifenoloxidase (PFO, σ -difenoil: oxigênio oxidoreductase), também conhecida como catecol oxidase, é uma enzima que contém íon Cu^{2+} no sítio ativo, catalisa a hidroxilação de monofenóis e a oxidação de σ -difenoil para a sua correspondente quinona, na presença de oxigênio.

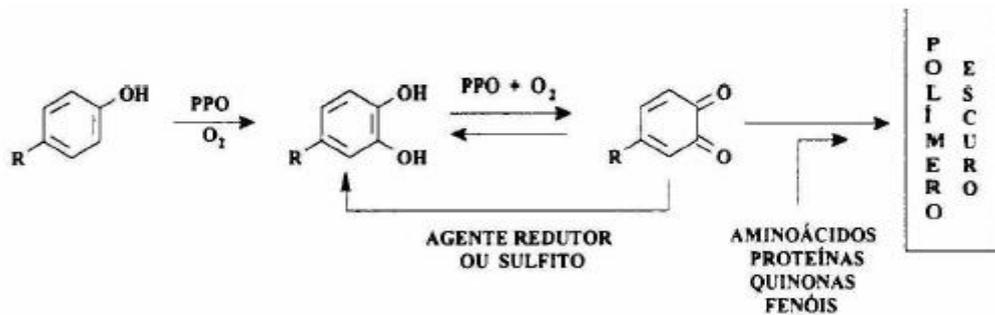


Figura 1 Esquema do escurecimento enzimático pela ação da polifenoloxidase Passardi (2004)

As o-quinonas formadas são instáveis e, assim, polimerizam-se rapidamente ou reagem com aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando alterações estruturais e funcionais, diminuição do valor nutricional dos alimentos e dando origem a pigmentos escuros (melaninas). O escurecimento enzimático também pode estar relacionado à ação da peroxidase (PER) que é uma enzima amplamente distribuída no reino vegetal e sua presença foi descrita em grande número de espécies (PASSARDI et al., 2004).

As peroxidases apresentam um caráter bifuncional no metabolismo oxidativo, pois podem utilizar o H₂O₂ para oxidar vários substratos por meio do seu ciclo catalítico peroxidativo e também podem produzir hidroxilas a partir do H₂O₂ por intermédio do seu ciclo catalítico hidroxílico. Assim sendo, as peroxidases de parede celular podem viabilizar o alongamento celular devido à produção de hidroxilas e a clivagem não-enzimática dos polissacarídeos de ligação cruzada. Por outro lado, estas enzimas também podem restringir o crescimento celular por meio do espessamento da parede celular em decorrência da eliminação do H₂O₂ associada à polimerização dos precursores da lignina (LISZKAY et al., 2004).

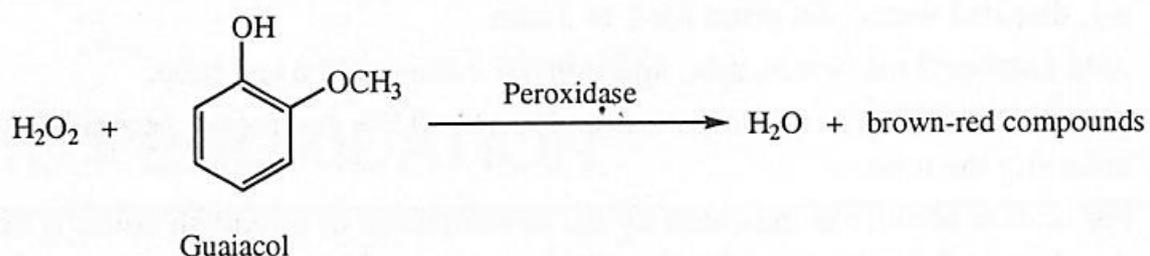


Figura 2. Ação da peroxidase sobre compostos fenólicos Fonte Passardi (2004).

2.5. Alfa-amilase

No processo de degradação do amido, as enzimas envolvidas podem ser classificadas de acordo com o modo de ação em endoamilases, exoamilases e enzimas de desramificação. As endoamilases são representadas pelas α -amilases, que hidrolisam o amido nas ligações internas (NUMAO et al., 2002).

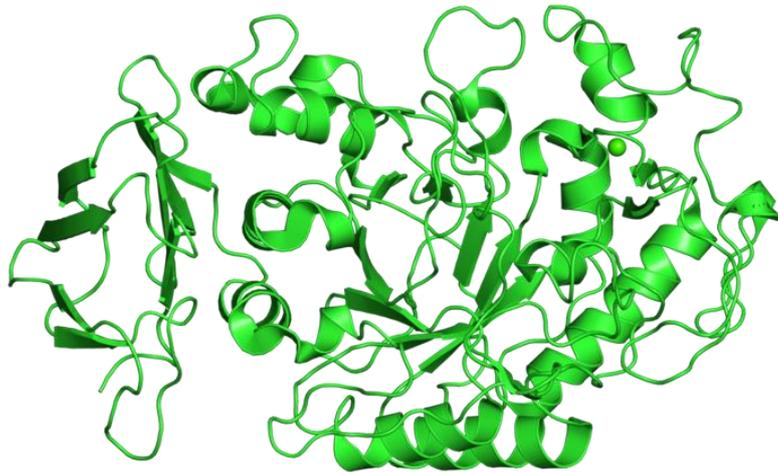


Figura 3. Estrutura tridimensional da alfa-amilase pancreática humana.
Fonte: Numao et. al. 2002.

A α -amilase é encontrada em plantas, animais, e micro-organismos e catalisa a hidrólise dos carboidratos complexos em açúcares simples, como maltose, maltotriose e glicose. Oficialmente, é denominada α -1,4-glucano-4- glucanohidrolase classificada pela sigla EC 3.2.1.1 atuante sobre ligações glicosídicas α -1,4. A hidrólise pela α -amilase ocorre em diversos passos, começando com a ligação do substrato à enzima, seguida da separação do polímero, e um processo hidrolítico para liberação de diversas moléculas menores (WANG et al., 2011).

A degradação do amido pelas α -amilases *in vitro* tem dois mecanismos propostos: o ataque múltiplo e o ataque em multicadeia. No primeiro, a enzima pode se ligar a uma determinada região do substrato e liberar apenas uma molécula, enquanto que a outra porção mais longa do polímero é retida para posterior hidrólise. Já no ataque em multicadeia, a ação da enzima ocorre com apenas uma reação hidrolítica, que resulta em duas moléculas de tamanho semelhante (TORMO et al., 2006).

Os produtos resultantes da digestão pela α -amilase são uma mistura de maltose, maltotriose e unidades ramificadas de glicose que contém 6-8 unidades de glicose com ligações tanto α -(1,4) e α -(1,6). A inibição da α -amilase humana pode dificultar a digestão dos carboidratos complexos, reduzindo assim a absorção e consequente diminuição da disponibilidade, promovendo ou apoiando a perda de peso e a diminuição dos picos de glicemia (CHOKSHI, 2007).

2.6. Inibição da alfa-amilase no feijão branco

Inibidores de α -amilase foram identificados em muitas espécies de plantas. Em 1943, Sandstedt e Kneen descreveram a inibição da atividade enzimática por substâncias derivadas de trigo, centeio, sorgo. Bowman (1945) encontrou atividade semelhante em extratos aquosos de feijão branco. Desde então, os inibidores de α -amilase foram isolados de várias outras espécies vegetais, incluindo muitas variedades de feijão comum, *Phaseolus vulgaris* (branco, vermelho e preto) (CHOKSHI, 2007).

Segundo Richardson (2001), os inibidores de α -amilase proteicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura terciária em 6 tipos: proteína-CM, kunitz, taumatina, knotina, tionina e lectina. Os inibidores do tipo lectina (α -AI) são tipicamente representados pelos inibidores encontrados no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), e são descritas 3 isoformas. A isoforma mais caracterizada, conhecida como α -AI1, foi identificada como um inibidor da α -amilase homólogo a fitohemaglutinina (PHA - estimula a mitose progressiva de linfócitos na cultura de células e causa eritro aglutinação). A segunda variante da α -AI, chamado α -AI2, é encontrada em alguns tipos de feijões selvagens.

Extratos brutos de feijão comum contendo inibidores da α -amilase tipo lectina foram usados *in vivo* como bloqueadores da absorção de amido no início de 1980, para o controle da glicemia de indivíduos portadores de diabetes mellitus e obesidade. Essas primeiras tentativas foram sem sucesso, devido à presença indesejável de PHAs e inibidores de proteases no extrato. Mais tarde, resultados mais consistentes foram obtidos a partir da administração de α -AI purificado. Esta classe de inibidores tem sido utilizada por suas propriedades inseticidas para proteger as sementes da predação de insetos (FRANCO et al., 2002).

Os insetos fitófagos, como muitos outros animais, utilizam-se de enzimas digestivas, tais como amilases e proteinases para processar os nutrientes obtidos das plantas, necessários para seu desenvolvimento. As plantas, por sua vez, utilizam diversos mecanismos para se defender do ataque dos insetos, dentre eles a produção de proteínas que inibem a ação das enzimas digestivas dos insetos. Os inibidores de enzimas digestivas podem ser encontrados em diversas partes das plantas, mas as sementes são as principais fontes dessas proteínas. Estudos recentes têm demonstrado que a presença dos inibidores de enzimas digestivas nas plantas aumenta sua resistência ao ataque das pragas (MARSARO et al., 2006).

No feijoeiro, o α -AI1 acumula-se nas sementes, perfazendo de 9 a 11% total de proteínas. A síntese do AI1 no feijão branco ocorre ao mesmo tempo em que se formam as proteínas faseolina e fitohemaglutinina (PHA), sendo acumulado nos vacúolos de armazenamento de proteínas. O α -AI1 é uma lectina do feijão comum, que é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, modificada no complexo de Golgi pela remoção de um peptídeo marcador e após uma N-glicosilação, é transportada para os vacúolos de armazenamento de proteína onde é proteoliticamente processada. O α -AI1 é detectável 17 dias após a polinização nos cotilédones e no eixo da semente, a partir daí, há um aumento constante e a concentração máxima ocorre depois de 28 dias de maturidade (FRANCO et al., 2002).

Evidências experimentais crescentes têm sugerido que extratos ou derivados de feijão branco, *Phaseolus vulgaris* podem ter a capacidade de reduzir a ingestão de alimentos, o depósito lipídico corporal e a glicemia. Os efeitos da utilização do α -AI também têm sido demonstrados na redução dos picos de glicemia e da concentração plasmática de insulina (MACCIONI et al., 2010).

Além disso, quando administrado em conjunto com as refeições, o α -AI tem-se mostrado eficaz na redução da absorção gastrointestinal de carboidratos, sem causar desconforto (CHOKSHI, 2007). Notadamente, esse extrato mostrou-se eficaz na redução da ingestão de alimentos e líquidos altamente palatáveis, incluindo biscoitos amanteigados e bebidas achocolatadas e de alimentos regulares ou amido enriquecido, o que sugere que os derivados de *Phaseolus vulgaris* podem ter capacidade de reduzir seletivamente o apetite para a ingestão destes produtos (MACCIONI et al. 2010).

2.7. Compostos bioativos

O feijão, assim como outras leguminosas, contém elevado teor de compostos bioativos, tais como: inibidores enzimáticos, lectina, fitato, oligossacarídeos e polifenóis (principalmente taninos). Esses compostos desempenham efeitos positivos, negativos ou ambos, e assim, alguns deles são considerados fatores antinutricionais ou assumem efeitos preventivos a algumas doenças. Podem ainda auxiliar na redução da glicemia, doenças cardiovasculares, de diabetes, do sobrepeso, possui capacidade antioxidante e capacidade anti-inflamatória (CAMPOS-VEGA et al., 2010; OOMAH et al., 2010; RAMÍREZ - JIMÉNEZ et al., 2014; LUNA-VITAL et al., 2015; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2018).

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são originados no metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas e são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (OZCAN et al., 2014).

Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir com a cor, sabor, principalmente pelo sabor amargo e adstringência, odor e estabilidade oxidativa dos alimentos que os contêm, embora em alguns alimentos os compostos fenólicos não proporcionam sabor amargo e adstringente. Em adição ao valor nutritivo de feijões, significativa quantidade de compostos fenólicos é encontrada no tegumento, tais como os ácidos fenólicos, flavonóides e antocianidinas (MACHADO et al. 2008).

2.8. Carboidratos

2.8.1 Lignina

A lignina é uma substância orgânica de natureza química complexa. É impermeável à água, muito resistente à pressão e pouco elástica. Depois da celulose, é o polímero vegetal mais abundante. A lignina deposita-se na parede celular, partindo da lamela média, onde é encontrada em maior quantidade (60% a 90%). A

porcentagem decresce bastante quando se passa da parede primária para a secundária. É a lignina que dá às células vegetais grandes resistência à pressão e à tração (SCHUETZ, 2015).

A teoria da lignificação em grãos de feijão relaciona o desenvolvimento do endurecimento com a polimerização dos compostos fenólicos (provenientes principalmente do tegumento que são ricas nesta substância), medida pela polifenoloxidase e pela formação de ligações cruzadas entre os compostos fenólicos e as proteínas da parede das células dos cotilédones. Considerando que a polifenoloxidase se encontra envolvida com a reação de polimerização dos compostos fenólicos, o aumento de sua atividade poderia estar envolvido com o processo de lignificação da lamela média e da parede celular e conseqüentemente redução na absorção de água e endurecimento do feijão (VOXEUR, WANG & SIBOUT, 2015).

2.8.2. Oligossacarídeos da família rafinose

Os oligossacarídeos da Família Rafinose, representados pela rafinose, estaquiose e verbascose, são açúcares de baixo peso molecular que contêm um ou mais grupos α -D-galactopiranosil na sua estrutura. Na estrutura dos oligossacarídeos a sacarose é a unidade básica e pode conter um ou mais grupos α -D-galactopiranosil (α -D-Gal), sendo que as unidades de α -galactosil estão sempre do lado esquerdo da sacarose, ligadas ao carbono 6 da molécula de glicose (ZHAO et al., 2017).

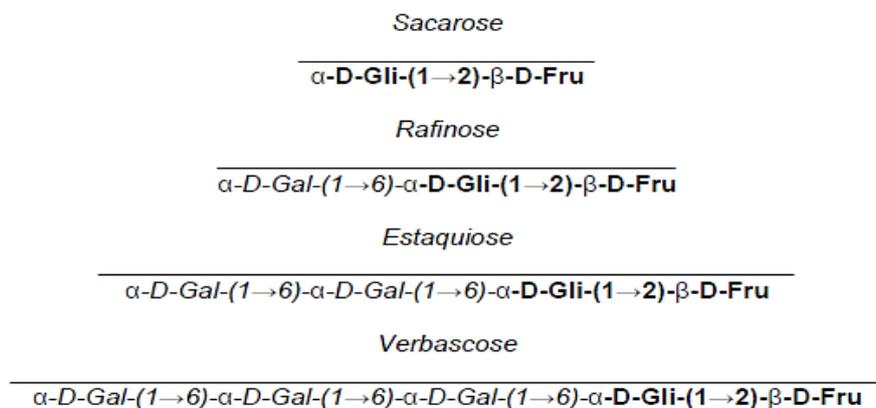


Figura 4. Relação estrutural dos oligossacarídeos da família rafinose.
Fonte: Oliveira et al. 2001

Os oligossacarídeos da Família Rafinose são sintetizados e armazenados em sementes e tubérculos, durante o processo de amadurecimento, permanecendo

estáveis nos estágios iniciais da germinação. As proporções desses oligossacarídeos nas leguminosas variam de acordo com o grau de maturação da planta e de condições de cultivo como composição do solo e temperatura (ZHAO et al., 2017).

Eles estão presentes em quantidades relativamente altas (2-15% de peso seco) em sementes de leguminosas. Nos grãos, a estaquiose é o oligossacarídeo mais encontrado, seguido pela rafinose e verbascose, sendo que, a distribuição desses açúcares varia de acordo com o grão (XU, CHAO & WAN, 2009).

Oligossacarídeos da família rafinose, especialmente a rafinose e a estaquiose são considerados os maiores fatores de flatulência após a ingestão de feijão ou outros legumes (SINGH, BANERJEE & ARORA, 2015). Esses açúcares fazem parte do grupo de carboidratos dietéticos reconhecidos como oligossacarídeos não digeríveis.

Fodmaps (**F**ermentable **O**ligosaccharides, **D**isaccharides, **M**onosaccharides and **P**olyols), são o conjunto de alimentos fermentáveis que são mal absorvidos pelo nosso organismo. Esses alimentos, incluído o feijão, são fermentáveis pela microbiota intestinal, causando desconforto abdominal e flatulência (MOLINA-INFANTE et al., 2016). Sendo estes oligossacarídeos hidrossolúveis, pode-se reduzi-los por lixiviação. Segundo alguns autores (OLIVEIRA et al., 2001) a realização do remolho pré-cocção pode ser uma alternativa válida para diminuir as proporções dos oligossacarídeos presentes, tornando-se mais efetiva se a água for eliminada antes da cozedura.

A ausência da enzima α -galactosidase, responsável pela quebra das ligações galactosídicas α -1-6 no trato gastrointestinal, faz com que os oligossacarídeos se acumulem no intestino delgado e sejam fermentados por bactérias anaeróbias. A fermentação dos oligossacarídeos leva a produção de ácidos graxos de cadeia curta e gases como dióxido de carbono, hidrogênio e metano, que podem ocasionar diarreia osmótica e dor abdominal (NA et al., 2016).

2.9. Fatores antinutricionais

A biodisponibilidade de um nutriente relaciona-se com a capacidade do organismo em utilizá-lo após sua ingestão. Os alimentos possuem em sua composição elementos químicos que causam diminuição da utilização orgânica de alguns nutrientes, sendo tais compostos denominados fatores antinutricionais. Os fatores antinutricionais como os fenólicos, ácido fítico, entre outros, quando ingeridos,

ocorre redução na digestibilidade proteica, assim como efeitos indesejáveis na digestão relacionados à flatulência (OLIVEIRA et al., 2001).

As sementes das leguminosas contêm diversos compostos com efeitos negativos sobre seu valor nutritivo, como os inibidores de tripsina, os fitatos, os polifenóis (principalmente taninos, nos feijões) e oligossacarídeos (rafinose e estaquiose). Esses compostos são conhecidos como fatores antinutricionais ou, conforme alterações de conceito ainda em processo de discussão, compostos bioativos, por apresentarem também efeitos benéficos. (LIN e LAI, 2006).

2.9.1. Taninos

Tanino é um termo químico usado para descrever uma ampla classe de compostos, que inclui todos os polifenóis em plantas com peso molecular superior a 500 Dalton. São normalmente divididos em dois grupos: taninos condensados (ou proantocianidinas) e taninos hidrolisáveis (os mais encontrados em feijão comum). Em grãos de feijão, estes metabólitos encontram-se principalmente no tegumento e, juntamente com as antocianinas, determinam a cor, tonalidade e intensidade dos grãos. O conteúdo de taninos varia de acordo com a coloração da casca (FRAGA, 2009).

Taninos muitas vezes são considerados fatores antinutricionais, pois se associam à redução na digestibilidade de proteínas e carboidratos, além de reduzir a absorção de alguns minerais (MOURA et al., 2005). O principal impacto dos taninos na nutrição deve-se à habilidade desses compostos em complexar vários tipos de moléculas. Além da capacidade dos taninos em precipitar proteínas, eles também são capazes de interagir com outras macromoléculas, como carboidratos, membrana celular de bactérias e íons metálicos (EL-HADY & HABIBA, 2013).

Sabe-se que tanto a hidratação prévia, quanto a cocção tem papel importante na redução deste composto fenólico, pois durante o processamento os taninos podem migrar para a água de maceração e para o caldo de cocção, sendo possível que alguns deles se difundam para o endosperma do cotilédono e se liguem às proteínas. Essa perda aparente de taninos pelo cozimento não é devido à destruição química e sim devido a mudanças em sua solubilidade e reatividade (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008).

2.9.2. Ácido fítico

O ácido fítico e seus sais constituem a principal forma de armazenamento de fósforo em sementes de cereais e leguminosas e sua ação antinutricional está baseada na capacidade de formar complexos insolúveis com minerais, proteínas, diminuindo a biodisponibilidade destes, além de inibir enzimas proteolíticas e amilolíticas (CARBONARO et al., 2000).

Na maioria das sementes de leguminosas, o fósforo fítico constitui aproximadamente 80% do fósforo total. Vários complexos insolúveis formados pelo ácido fítico com minerais, como o cálcio, o zinco, o ferro e o magnésio, podem torná-los indisponíveis, dependendo da concentração de ambos (ácido fítico e minerais) no alimento, das condições do processamento, da digestão ou hidrólise do fitato pela fitase e da capacidade da mucosa intestinal para absorver minerais (CARBONARO et al., 2000).

O fitato pode ser considerado bastante estável ao calor. Tanto a maceração em temperatura ambiente quanto a cocção do feijão, não alteram o conteúdo de ácido fítico (RANILLA et al., 2010).

2.9.3. Digestibilidade de proteínas

Segundo Martínez-Manrique (2011), a digestibilidade pode ser definida como um processo que engloba a hidrólise das proteínas pelas enzimas digestivas até aminoácidos e posterior absorção dos mesmos pelo organismo, sendo expressa em porcentagem. Portanto o valor nutricional da proteína é determinado pela sua digestibilidade, seu conteúdo de aminoácidos essenciais e pela disponibilidade dos mesmos.

A digestibilidade proteica é um parâmetro nutricional que avalia o aproveitamento de uma fonte proteica, podendo ser influenciada por vários compostos. A reduzida digestibilidade das proteínas do feijão (40 a 70%) e de outras leguminosas é multicausal, sugerindo a ação de fatores ligados à casca (taninos), aos cotilédones (inibidores de natureza proteica, como os inibidores de proteases e lectinas, e outros como taninos, fitatos, saponinas e alcalóides), à estrutura (compacta estrutura de suas proteínas, o que fornece resistência à hidrólise enzimática), a outros

componentes do grão tais como amido, hemicelulose, fibras, minerais e outras proteínas, e ao processamento e armazenamento (SEBASTIÁ et al. 2002).

Em geral, grãos crus apresentam teores maiores de compostos antinutricionais em relação aos mesmos grãos cozidos. Assim, a desnaturação das proteínas tende a melhorar a digestibilidade, por melhorar a flexibilidade das proteínas e facilitar o acesso das enzimas proteolíticas. (DÍAZ-BATALLA et al. 2006).

2.9.4. Inibidores de protease

Encontrados em ampla distribuição no reino vegetal, alguns compostos são capazes de inibir a atividade das enzimas tripsina, quimiotripsina, amilase e carboxipetidase. São considerados um dos fatores envolvidos na baixa digestibilidade das proteínas do feijão.

Os tipos de inibidores de proteases mais amplamente distribuídos são Bowman-Birk e Kunitz, esses últimos encontrados na subfamília Papilionidae, da qual o feijão-comum faz parte. A tripsina humana é fracamente inibida pelo inibidor Kunitz, já o inibidor Bowman-Birk (BBI) é relativamente estável à exposição ao suco gástrico humano. Em muitas plantas, particularmente em sementes de leguminosas, se encontram os inibidores de proteases, entre os quais estão os inibidores de tripsina e quimiotripsina, que reduzem o valor nutritivo das sementes e a disponibilidade dos aminoácidos (LIERNER, 1994).

A forte inibição de tripsina tem sido associada à hiperplasia e/ ou hipertrofia pancreática, pelo aumento excessivo da secreção de tripsina pelo mecanismo de auto-regulação por feed back. No entanto, atualmente o interesse por esta classe de inibidores de proteases é principalmente baseado nas descobertas de que o BBI pode atuar como agente preventivo do câncer. Os BBIs também mostraram atividade antiinflamatória pela inibição de proteases envolvidas no processo inflamatório (AMORIM et al., 2009).

2.10. Análise sensorial

A análise sensorial é uma ciência multidisciplinar que utiliza um grupo de pessoas que utilizam os sentidos (visão, olfato, paladar, tato e audição) para evocar,

medir, analisar e interpretar características sensoriais e a aceitabilidade dos produtos alimentícios, e muitos outros materiais (LAWLESS e HEYMANN, 1998).

A qualidade sensorial não é uma característica própria do alimento, mas sim o resultado da interação entre esse alimento e o homem. É uma resposta individual, que varia de pessoa para pessoa, em função das experiências, de expectativas, do grupo étnico e de preferências individuais (GULARTE, 2009).

A análise descritiva pode ser considerada como a primeira fase na caracterização sensorial de um alimento, desde que uma terminologia pré-definida para descrever as percepções sensoriais seja empregada. Os testes são realizados em cabines individuais e as amostras são codificadas. Escalas de intervalo são utilizadas para medir a intensidade de percepção dos atributos sensoriais (GULARTE, 2009).

O Teste de Avaliação de Atributos é um teste derivado da análise descritiva, que avalia todas as características do produto, através de escalas, que determinam a intensidade de cada atributo sensorial presente na amostra. Este teste se diferencia do ADQ pelo fato que o pesquisador é quem determina os atributos, e não os julgadores (DUTCOSKY, 1996).

Entre as culturas de grãos, o feijoeiro é a que exibe o mais alto nível de variabilidade quanto à cor, tamanho e forma da semente, sendo que estas características influenciam as pessoas quanto à preferência por determinada variedade (CARNEIRO, 2005).

Apesar da grande produção e consumo de feijão no Brasil, há carência de estudos que caracterizam aparência, aroma, textura e sabor dos grãos das diversas variedades de feijão, ou seja, na maioria das vezes não se conhece o perfil sensorial dos grãos de feijão, principalmente daquelas variedades melhoradas geneticamente (GULARTE et al., 2017).

2.11. Proteoma

O termo "proteoma" foi utilizado pela primeira vez por Marc Wilkins em 1994 e foi originalmente definido como conjunto de proteínas provenientes do genoma. E o termo "Proteômica" foi definido como o estudo do proteoma (WILKINS et al., 1996). Desde então, muitas definições têm sido utilizadas, como o termo "proteoma", para

referir-se à identificação sistemática do perfil proteico total do genoma (BLACKSTOCK & WEIR, 1999), ou seja, refere-se ao conjunto de proteínas que são expressas pelo genoma de um organismo ou tipo celular. No entanto, esse termo pode também ser usado em um sentido menos universal, para se referir ao conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida da célula (ABBOT, 1999).

A proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais e interações, entre outras. Portanto, o passo do genoma para o proteoma é um passo do nível da informação genética para a função celular. As concentrações de proteínas que são alteradas em determinadas condições fisiológicas podem mostrar quais funções sofrem modificações (JUNGBLUT, 2001). Dessa forma, a análise do proteoma torna-se importante em estudos de comparações da expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo.

Existem várias formas de se analisar um perfil proteômico. A abordagem clássica é o estudo da expressão proteica global (*expression proteomics*), que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas de extratos de células ou tecidos e, para tal, dois princípios são utilizados: o de separação e o de identificação (JOCELYN & ILANG, 2002).

As duas técnicas de separação mais utilizadas são a eletroforese bidimensional e a cromatografia líquida multidimensional. Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas por uma focalização isoeletrica (IEF) e, posteriormente, por massa molecular. Essa estratégia resulta em uma alta resolução para separar proteínas de extrato proteico complexo (JOUBERT et al., 2000).

A espectrometria de massa permite a identificação de proteínas em pequenas concentrações por sequenciamento e os dados gerados são, então, comparados com os obtidos nos bancos genômicos, que favorecem a análise do proteoma, aliando espectrometria de massa com análise *in silico* do proteoma (CAGNEY et al., 2003).

2.12. Eletroforese bidimensional

Na eletroforese bidimensional, a primeira dimensão consiste em separar as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI) por focalização isoeletrica (IEF) e a segunda dimensão as separa de acordo com sua massa molecular por meio de

eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, conhecida por SDS–PAGE (O’FARREL, 1975).

Nesta técnica, todas as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente, fornecendo informações úteis sobre ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética, se caracterizando como um método de separação muito eficiente. Sua precisão é tanta que variações em um único aminoácido podem resultar na mudança de posição de uma proteína em um gel bidimensional (JUNGBLUT, 2001).

Embora cada *spot* não represente necessariamente uma proteína diferente neste mapa (proteínas fosforiladas e não fosforiladas aparecem como *spots* de *pI* diferente, assim como a glicosilação e outras modificações mudam consideravelmente o peso molecular dos polipeptídeos), a análise dos géis reflete a síntese de proteínas em cada tecido, nos diferentes estágios de desenvolvimento (MULLEN et al., 1996).

2.13. Identificação das proteínas *in silico*

A identificação de uma proteína pelos valores das massas moleculares de seus peptídeos é realizada por comparação *in silico* em banco de dados disponíveis. A impressão digital da proteína provê uma identificação virtual da sequência de interesse pela comparação dos valores de massas dos fragmentos obtidos experimentalmente após a digestão trípica com fragmentos virtuais obtidos de uma simulação de hidrólise trípica de proteínas de um banco de dados, considerando os seguintes aspectos:

1) a combinação das sequências de proteínas em um banco de dados possui um valor (score) e são “ranqueadas” de acordo com o número de combinações de massas de peptídeos, a acurácia das massas e o tamanho da proteína;

2) se há uma identificação a massa da sequência peptídica é correlacionada à sequência proteica do banco e

3) geralmente, um grande número de peptídeos com alta acurácia de massa é encontrado, este resultado pode significar em um alto score (ou seja, alta similaridade) e alta cobertura da sequência proteica (CRAVATT et al., 2007).

O software Image Master faz alinhamentos de espectros de massa de peptídeos ou proteínas obtidas experimentalmente com os deduzidos *in silico* a partir

do genoma ou banco de proteínas. Os dados obtidos também podem ser analisados utilizando-se outros programas, tais como PepTident, Mascot, ProFound, Ms-Fit, MultIdent, TagIdent ou CombSearch (PERKINS et al., 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras de feijão orgânico grupo comum (*P. vulgaris* L.), classe branco, variedade Branco Chileno, foi adquirida no município de Canguçu no Rio Grande do Sul (RS), Brasil, da safra 2015/2016.



Figura 5. Feijão Branco Chileno.
Fonte: própria autora

3.2. Condições de armazenamento

Os grãos foram embalados em sacos de polietileno com espessura de 80 μ m nos seguintes modelos: transparentes (permitindo a passagem da luz) e metálicos (bloqueavam a passagem de luz).



Figura 6. Sacos de polietileno metálico (a) e transparente (b). Fonte: própria autora

As condições de armazenamento foram: grãos refrigerados em geladeira ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) e grãos em temperatura ambiente (sem controle de temperatura), com e sem a presença de vácuo. As embalagens foram seladas a vácuo (Macsul modelo TP550-Brasil).

Os grãos foram armazenados no Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) situada no município do Capão do Leão – RS – Brasil, até a realização das análises laboratoriais, em um período de 365 dias.

O quadro 1 demonstra as médias psicrométricas registradas na cidade do Capão do Leão em que foi realizado o armazenamento.

Quadro 1. Médias psicométricas registradas no período de 2015/2016

Período de armazenamento (meses)	Médias da temperatura $\pm 0,1$ (°C)	Médias de umidade relativa ± 1 (%)
Janeiro	29	82,9
Fevereiro	30,2	83,1
Março	25,3	86,2
Abril	23,8	89,6
Maio	21,8	90,1
Junho	15,3	87,3
Julho	17	88,1
Agosto	19,7	84,2
Setembro	18,6	86,6
Outubro	21,9	86,2
Novembro	25,3	78,2
Dezembro	28,4	78,7

Fonte: Dados meteorológicos da Embrapa Clima Temperado.

3.3. Métodos

3.3.1. Delineamento

Foi utilizado delineamento completamente casualizado, num esquema fatorial $2 \times 2 \times 2 \times 5$ (presença e ausência de vácuo) x (presença e ausência de luz) x (temperaturas de armazenamento) x (tempos de armazenamento), com 3 repetições para cada tratamento. A Figura 6 apresenta o fluxograma do delineamento.

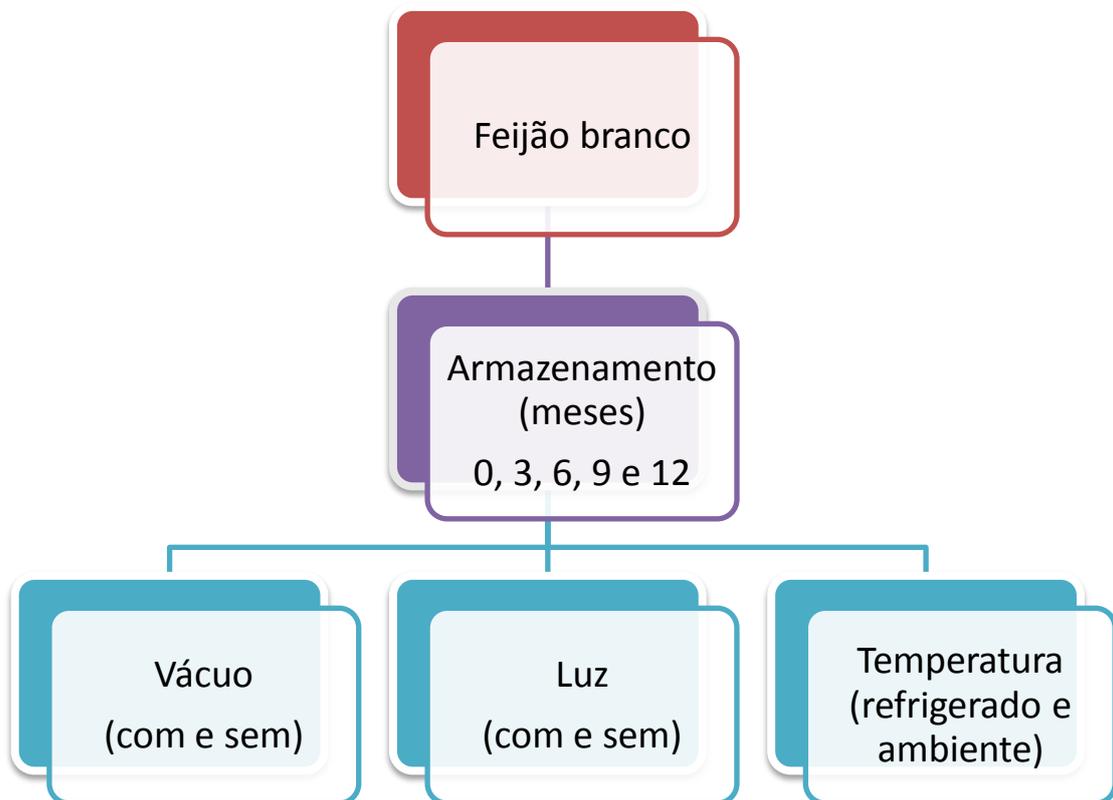


Figura 7. Fluxograma do delineamento das condições de armazenamento do feijão branco.

As Tabelas 1 e 2 representam o delineamento experimental do estudo.

Tabela 1. Delineamento experimental para avaliar o efeito das condições e do tempo de armazenamento nas propriedades físico-químicas, nutricionais e sensoriais de feijão branco

Variáveis Independentes			Variáveis dependentes
Luz	Vácuo	Temperatura	Tempo (meses)
			0
			Caracterização (peso de mil de grãos, dimensões, classificação, teor de umidade, proteína bruta)
Presença	Com	Refrigerado	
	Sem		
			3
			Parâmetros tecnológicos (cor, tempo cocção, coeficiente hidratação)
Ausência	Com	Ambiente	
	Sem		
			Parâmetros nutricionais (inibição alfa-amilase, fenóis)
			6
			Atividade enzimática (SOD, polifenoloxidase, peroxidase)
			9
			Antinutricionais (taninos, fitatos, digestibilidade,
			12
			inibição de tripsina, oligossacarídeos, lignina)

Tabela 2. Delineamento experimental para análise sensorial e análise proteômica de feijão branco sob o efeito das condições e tempo de armazenamento

Variáveis Independentes			Variáveis dependentes
Luz	Vácuo	Temperatura	Tempo (meses)
			0
Ausência	Com	Refrigerado	Extração das proteínas
			12
Presença	Sem	Ambiente	Análise da integridade das proteínas
			Eletroforese bidimensional
			Análise dos géis
			Perfil de massa Molecular e pI
			Análise comparativa das proteínas
			Análise Sensorial

3.4. Caracterização dos grãos

3.4.1. Classificação do feijão

A classificação dos grãos de feijão foi realizada no momento do recebimento das amostras (tempo inicial) e no final do armazenamento (12 meses) conforme a Instrução Normativa nº 12 (BRASIL, 2008).

3.4.2. Peso de mil grãos

Foram contados mil grãos de cada amostra, em 4 repetições, e pesados em balança de precisão (BRASIL, 2009).

3.4.3. Dimensões

As dimensões dos grãos de cada cultivar foram determinadas com o uso de um paquímetro digital, através da determinação do comprimento, da largura e da espessura de 50 grãos (BRASIL, 2009).

3.4.4. Teor de umidade e proteína bruta

As análises do teor de umidade e proteína bruta foram executadas de acordo com a metodologia indicada pela AOAC (2006).

3.5. Parâmetros de qualidade tecnológica dos grãos de feijão

3.5.1. Cor do tegumento

A cor do tegumento de grãos inteiros e uniformes foi determinada com o uso de um colorímetro Minolta modelo CR-300, o qual indica as cores em um sistema tridimensional. O eixo L* representa a variação de cor da amostra entre o preto e o branco, indicando a intensidade da luminosidade da amostra. O eixo a* apresenta a faixa de cores entre o verde e o vermelho, e o b* indica a escala colorimétrica do azul ao amarelo.

3.5.2. Tempo de cocção

Utilizou-se o método tátil de Vindiola, Seib e Hosney (1986) para avaliar o tempo de cocção. Os grãos de feijão branco foram hidratados previamente por um período de 10 horas, na proporção 1:3 de água. O tempo de cocção foi marcado após a saída da pressão pela válvula da panela., usando como indicador quando o centro do grão de feijão apresenta coloração branca quando pressionado entre placas de vidro.

3.5.3. Coeficiente de hidratação

O coeficiente de hidratação foi estabelecido de acordo com o método descrito por El-Refai et al. (1988).

3.6. Parâmetros nutricionais

3.6.1. Extração da faseolamina

Os grãos de feijão branco foram secos em estufa com circulação de ar até peso constante. Posteriormente, moídos até 60 mesh. A farinha obtida foi ressuspensa em água na proporção 1:5 p/v. A mistura foi submetida a agitação por 15 minutos e filtrada em tecido de organza. Logo após centrifugado por 10 minutos a 5000 x g. Recolhido o sobrenadante, o precipitado foi ressuspensa nas mesmas proporções de água, repetindo as operações 3 vezes. Os sobrenadantes foram recolhidos e aquecidos a 70°C por 5 minutos e centrifugados por 10 minutos a 5000 x g (PUSZTAI, 1995).

Precipitação isoelétrica por variação do pH do extrato proteico

O extrato proteico, preparado conforme no item 3.4.1.1, apresentou um pH igual a 6,3. Para precipitação isoelétrica de proteínas interferentes os valores de pH foram ajustados como proposto por Pusztai (1995). O pH foi ajustado para 5,0 com HCl 1mol.L⁻¹ e deixado em geladeira a 4°C por uma noite com posterior centrifugação a 7000xg por 10 min. Ao sobrenadante recolhido foi adicionado NaOH 1mol.L⁻¹ até o pH 9,5 e novamente colocado em geladeira por uma noite e centrifugado conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi recolhido e o pH foi corrigido com HCl 1mol.L⁻¹ para 6,9.

Em seguida, o extrato foi purificado com a adição 1,5mL de solução de cloreto de sódio 1% e centrifugado por 30 minutos a 3000 xg. O sobrenadante foi aquecido a 70°C por 15 minutos e centrifugado em seguida a 3000 xg por 60 minutos. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a 4°C por uma noite. O precipitado foi removido por centrifugação de 3000 xg por 30 minutos. Ao sobrenadante foi acrescido tampão citrato fosfato (proporção 1:5) pH 8,0 10mM. A inibição enzimática foi testada no sobrenadante.

3.6.2. Inibição da alfa-amilase

A determinação dos ensaios das atividades do inibidor da α -amilase e da enzima alfa-amilase foi realizada utilizando a metodologia proposta por Ngoh & Gan (2016). Para se determinar a atividade do inibidor da α -amilase, é necessário o conhecimento da atividade desta enzima.

Ensaio da atividade da alfa-amilase

Uma alíquota de 0,5 mL de suspensão de amido 1 % em tampão fosfato de sódio 0,2 mol. L⁻¹ (pH 7,0) foram adicionados a 0,25 mL de solução de enzima α -amilase. Ao final de três minutos, a reação foi finalizada com a adição de 2 mL do ácido dinitrosalicílico e aquecido em água em ebulição por 20 minutos. O tubo então foi resfriado em água corrente e o volume foi completado com água destilada para 13 mL. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco. Os açúcares redutores liberados foram expressos em maltose. Uma unidade de atividade enzimática é definida como aquela que libera do amido solúvel, um micromol de grupos redutores (calculados como maltose) por minuto, a 37 °C e pH 7,0, nas condições especificadas.

Ensaio do inibidor de alfa-amilase

Foram utilizados 100 μ L do extrato purificado contendo faseolamina, e adicionados 500 μ L de solução de enzima α -amilase, incubando-se por 10 minutos a 37 °C. A esta mistura, foi adicionado 0,5 mL de solução de amido 1 %. Ao final de 10 minutos, a reação foi finalizada com a adição de 1 mL do ácido dinitrosalicílico e aquecido em água em ebulição por 5 minutos. A solução foi resfriada em água corrente e o volume completado com água destilada para 10 mL. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco (amido+amostra) e uma amostra controle (amido+enzima). Os resultados da inibição da α amilase foram expressos em (%) de inibição.

3.6.3. Fenóis totais

Determinação pelo método descrito por Nasar-Abbas (2008). O extrato foi feito a partir de 2g de feijão cozido, seco e moído e determinado pela reação de carbonato de sódio e *Folin-Ciocalteu* 1 N. Os teores de compostos fenólicos foram expressos em mg de ácido tânico por grama de amostra, através de curva realizada com padrão de ácido tânico.

3.7. Atividade Enzimática

3.7.1. Superóxido dismutase

A determinação da atividade da SOD (DEL LONGO et al. 1993), considera a capacidade da enzima em inibir a foto redução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). A atividade foi determinada pela adição de 50 mL de extrato bruto a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 mM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 mM de riboflavina em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8.

A reação foi iniciada pela iluminação das amostras, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25° C. Após 5 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz. O composto azul formado (formazana) pela foto redução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

As amostras consideradas '*branco*' para a análise receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio, portanto, abrigados da luz. Uma unidade de SOD é definida como a atividade da enzima necessária para a inibição de 50 % da foto redução do NBT. A atividade de SOD foi expressa como atividade específica (Unidade SOD mg⁻¹ de proteína), conforme equação 1 a seguir:

Eq. 1

$$\text{Atividade Específica da SOD} = \frac{\text{U}}{\mu\text{g de proteína}} = \frac{\% \text{ de inibição} \times \text{volume da amostra } \mu\text{L}}{50 \% \times \text{concentração de proteína } \mu\text{g } \mu\text{L}}$$

3.7.2. Atividade da peroxidase (PER)

A atividade da enzima peroxidase foi determinada de acordo com a técnica descrita por Ferhman e Diamond (1967). O extrato enzimático (1 mL) foi incubado com 0,4 mL de peróxido de hidrogênio a 3% e 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol. L⁻¹ pH 5,0 e 4,0 mL de guaiacol a 0,5%. As leituras foram feitas imediatamente em espectrofotômetro 470nm durante 2 minutos. Uma unidade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima que provocou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto de reação. A atividade enzimática da peroxidase foi expressa em unidade. g⁻¹ de feijão. minuto⁻¹.

3.7.3. Atividade da polifenoloxidase (PFO)

O extrato enzimático utilizado foi o mesmo da peroxidase com adição de catecol como meio de reação, durante 2 minutos (ZAUBERMAN, 1991). A atividade foi expressa unidade. g⁻¹ de feijão. minuto⁻¹.

3.8. Antinutricionais

3.8.1. Taninos totais

As análises de taninos totais foram realizadas através da construção da curva padrão e das leituras das soluções, a uma absorbância de 725nm, obtidas a partir das amostras com a utilização de ácido tânico, reagente de Folin-Denise solução de carbonato de sódio, conforme metodologia da AOAC (2006). Os taninos totais foram expressos em equivalentes de ácido tânico.g⁻¹ amostra.

3.8.2. Digestibilidade proteica

Foi empregada a técnica descrita por Hsu (1977), para a determinação da digestibilidade proteica *in vitro*. A farinha (com o teor de nitrogênio conhecido) foi digerida com pepsina e pancreatina, em seus pHs ótimos. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético. A digestão enzimática foi caracterizada pela queda do pH após 10 minutos com o ajuste da equação que descreve a queda do pH versus tempo.

3.8.3. Teor de ácido fítico

A determinação do teor de ácido fítico foi realizada de acordo com Haug e Lantzsch (1983). Resultados expressos em mg de equivalentes de ácido fítico.g⁻¹ de amostra através da curva padrão de ácido fítico hidratado.

3.8.4. Inibição da tripsina

Para a determinação da atividade inibitória de tripsina na presença ou ausência de inibidores, utilizou-se o método proposto por Kakade et al. (1974), no qual foi medida a atividade proteolítica da tripsina bovina utilizando como substrato sintético o D,L-BApNA. O cálculo da atividade de inibidor de tripsina (TIA) foi feito pela conversão dos resultados obtidos em miligramas de tripsina pura inibida por grama de amostra.

3.8.5. Oligossacarídeos

Extração

Os oligossacarídeos foram extraídos de 10 g de farinha de feijão cozido seco diluindo-se em 10ml de álcool etílico 80% (BARAMPAMA & SIMARD,1994). As amostras foram colocadas em banho-maria a 50°C por 3 horas, agitando 15 segundos a cada uma hora. Coletado o sobrenadante, realizou-se novamente o mesmo procedimento ao precipitado acrescentando mais 10 mL de etanol e deixe em banho por mais uma hora. Centrifugou-se a 7000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram então rotavevaporados a 50°C e filtrados em papel filtro. O líquido filtrado foi colocado em placas de petri e secos em estufa ventilada a 30°C.

Quantificação

O cromatógrafo consistiu no sistema HPLC Shimadzu, provido de injetor automático, coluna com uma bomba quaternária, detector de índice de refração, coluna modelo Luna NH2 100A (250 x 4,6 mm, 5 µm - Phenomenex - USA) e fase móvel contendo acetonitrila-água ultrapura (70:30). As concentrações de rafinose e estaquiose foram calculadas usando as medias das áreas dos picos comparados com os padrões, com tempos de retenção de 10 e 13 minutos respectivamente e expressas em g.100g⁻¹ de feijão seco.

3.8.6. Lignina

Os teores de lignina foram determinados pelo método gravimétrico de oxidação da lignina pelo permanganato de potássio, proposto por Van Soest e Wine (1967), na fibra detergente neutro/ácido. A lignina foi expressa em g.100 g⁻¹ de matéria seca. Análises de microscopia ótica também foram realizadas para a visualização da presença ou ausência de lignificação nas amostras que apresentaram maiores e menores valores de lignina pelo método gravimétrico, utilizando-se corante azul de metileno 1% em bórax 1%. As amostras foram vistas e fotografadas usando um microscópio de luz composto OlympusBX51 (Olympus Corporation, USA) e suas imagens digitais coletadas usando uma câmera digital (Sony DSC-W180, EUA).

3.9. Análise Sensorial

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. Participaram da análise sensorial uma equipe treinada de 20 avaliadores de ambos os gêneros, constituídos por estudantes da Universidade, todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram informados sobre os procedimentos da pesquisa.

Utilizou-se Método Descritivo com o Teste de Perfil de Atributos nos grãos de feijão cozidos e crus no tempo zero e após 12 meses, com escala não estruturada de 9 pontos tendo como objetivo avaliar a percepção dos consumidores quanto a manutenção das características sensoriais dos grãos de feijão após o armazenamento. A amostra foi codificada com três dígitos aleatórios (DUTCOSKI, 1996) oferecida em pratos de porcelana, pesando 10 g a porção. O teste foi realizado em cabines individuais, com luz branca, isentas de ruídos e odores, em horário distante das principais refeições.

3.10. Análise proteômica

3.10.1. Extração das proteínas

O método de extração das proteínas do feijão branco foi baseado no protocolo de Faurobert, Pelpoir & Chaib (2007) e foi realizado nas amostras de feijão com tempo inicial de armazenamento, nas amostras que ficaram refrigeradas por 12 meses à vácuo e sem presença de luz e nas amostras que ficaram armazenadas por 12 meses em temperatura ambiente sem vácuo e com presença de luz. A análise proteômica foi realizada, portanto, nos feijões que apresentaram as melhores e piores respostas em suas condições físico-químicas durante o armazenamento.

3.10.2. Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A quantificação das proteínas totais nos extratos foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Bradford (1976) a partir da curva analítica de BSA.

3.10.3. Análise da integridade das proteínas

Foram escolhidas, aleatoriamente, dez amostras de proteínas totais extraídas para visualização em gel de poliacrilamida 12,5% (m/v), a fim de observar a integridade das mesmas e a eficiência do método de extração. A separação das proteínas ocorreu por eletroforese, a 100V, 400mA e 50W, durante, aproximadamente, 1hora e 40minutos.

3.10.4. Eletroforese bidimensional

Para a eletroforese 2-D, foram utilizadas tiras de 7 cm, com gradiente de pH 3-10. A rehidratação foi realizada utilizando-se solução protéica contendo 60 µg de proteínas e quantidade de tampão de rehidratação (8 M uréia, 2 M tiuréia, 4% (p/v) chaps, 20 mM DTT) suficiente para completar 150 µL, durante 12 h. Em seguida, procedeu-se a focalização isoeletrica (IEF) à temperatura de 20°C e amperagem de 50uA por tira. Em seguida, procedeu-se à separação eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) com coloração de Coommasie Blue e avaliação dos géis no software Image Master 2-D Platinum 7 (G&E Healthcare).

Análise dos géis

Para a aquisição das imagens dos géis e análise dos dados, os géis bidimensionais corados com Coommasie Blue foram digitalizados utilizando o scanner Image Scacnner III LabScan (G&E Healthcare) e as respectivas imagens analisadas no software Image Master 2-D Platinum 7 (G&E Healthcare). Os *spots* proteicos foram detectados automaticamente pelo programa e em seguida foram feitas correções manuais. Os géis foram alinhados e agrupados em triplicata e, então, a determinação quantitativa dos volumes de cada spot foi realizada (teste Tukey). Os spots foram quantificados em unidades de volume (área versus intensidade).

Análise de bioinformática

A anotação funcional de proteínas identificadas foi realizada com base nos seguintes bancos de dados de proteína: UniProtKB, NCBI, bem como na literatura. O peso molecular e pls teóricos das proteínas caracterizadas foram obtidos através da seguinte ferramenta: http://web.expasy.org/compute_pi/, e os experimentais no software Image Master 2-D Platinum 7 (G&E Healthcare). As funções putativas foram

pesquisadas através do UniprotKB, bem como na literatura (De La Fuente et al., 2011; De La Fuente et al., 2012; Natarajan et al., 2013; Rossi et al., 2017).

3.11. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA com comparação de médias através do teste de Tukey a um nível de significância de 5% e curvas ajustadas por meio da análise de regressão com seleção dos melhores modelos. Os descritores da análise sensorial foram discriminados através dos coeficientes de modelos de variâncias e valores-p. A análise de componentes principais (ACP) foi realizada na matriz de covariância dos escores de atributo em todos os avaliadores para se obter um mapa sensorial das amostras. O teste de correlação entre as variáveis dependentes dos atributos sensoriais foi realizado através do coeficiente de correlação de Pearson. Os dados qualitativos e quantitativos foram processados com a utilização dos softwares *Minitab 18* e *XLStat Free Trial*.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização os atributos físico químicos dos grãos

4.1.1. Classificação do feijão

Os grãos de feijão foram classificados no tempo 0 e 12 meses, conforme a Classificação Oficial de Qualidade e Conservação de Feijão do MAPA (BRASIL, 2008). No início do armazenamento os feijões foram classificados como: Grupo I (feijão comum proveniente da espécie *Phaseolus vulgaris* L.), Classe Branco (possui no mínimo 97% de grãos de coloração branca) e Tipo 1 (de acordo com os limites de tolerância de defeitos graves estabelecidos no Regulamento Técnico). Após 12 meses uma nova classificação foi realizada. As amostras refrigeradas mantiveram-se como Tipo 1, assim como as amostras que ficaram em temperatura ambiente à vácuo e sem presença de luz. No entanto, as amostras que estiveram expostas à luz, sem presença de vácuo e em temperatura ambiente apresentaram 2,86% de feijões ardidos, 2,38% de defeitos leves e 9,74% de picados, enquadrando-se, portanto, em Tipo 2 segundo o Regulamento Técnico de defeitos graves.

Esse aumento dos defeitos graves aconteceu devido a ocorrência de insetos conhecidos como caruncho do feijão (*Acanthoscelides obtectus*). Os grãos são contaminados na lavoura, onde a fêmea deposita seus ovos no tegumento e em condições ótimas de umidade e temperatura, a larva é liberada, furando e alimentando-se do grão para que possam transformar-se em pupa. Os grãos, por serem orgânicos, não tiveram nenhum tipo de expurgo antes do armazenamento. Para descontaminar as amostras foram descartados os feijões com maiores defeitos e com os demais foi realizado o controle biológico com cravos-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb) (HALFELD-VIEIRA et al., 2016) para assim, manter as características do sistema orgânico.



Figura 8. Grãos de feijão contaminados com carunchos. Fonte: própria autora.

Segundo Lima Júnior (2013), praticamente, a maioria dos insetos se alimenta do endosperma, na fase larval, acarretando perdas quantitativas e qualitativas nos grãos.

4.1.2. Dimensões e peso de mil grãos

Caracterizando a variedade de feijão Branco Chileno, observamos que a massa de mil grãos apresentou em média 460 g, massa consideravelmente maior comparando-se com os feijões preto e carioca, que possuem em média uma variação de 175 a 262g. Suas dimensões são igualmente maiores, com comprimento de 14,56mm, largura de 7,18mm e espessura 5,70mm.

4.1.3. Teor de umidade

O teor de umidade dos grãos de feijão branco sob diferentes condições e tempos de armazenamento estão apresentadas a seguir:

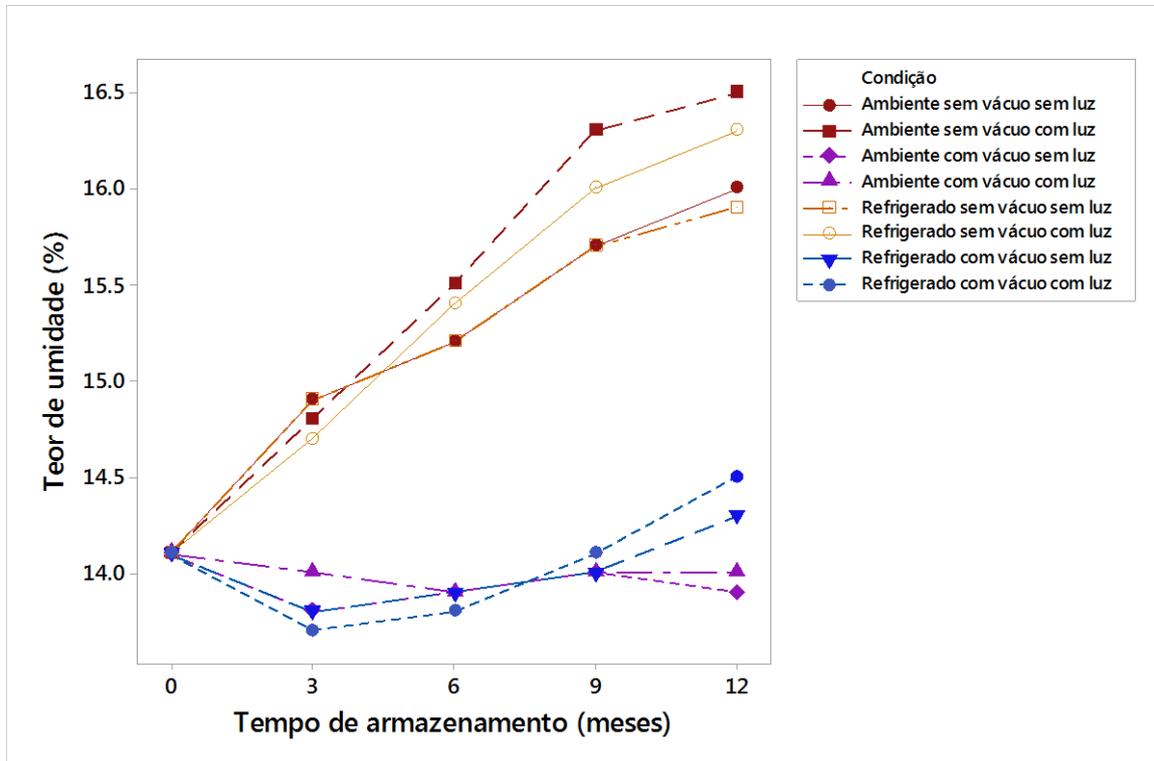


Figura 9. Teor de umidade (%) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 3. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do teor de umidade

Condição	Valor F	Pr > F
Luz	0,7	0,388
Temperatura	0,0	0,942
Vácuo	85,8	<,000
Tempo	8,4	0,000

*significativo a $p < 0,05$.

Os grãos armazenados apresentaram teor de umidade inicial de 14,1% não havendo variações significativas a partir do 3º mês ($p < 0,05$) nas amostras armazenadas com vácuo. Foi possível também verificar que há relação significativa entre as condições de armazenamento e tempo com o teor de umidade. Esses dados reforçam a hipótese de que as embalagens seladas à vácuo são eficientes para formarem uma barreira entre o interior da embalagem e o ambiente exterior, minimizando trocas gasosas.

Pode-se observar que a ausência de vácuo permitiu maiores trocas de umidade com o ambiente. A variação da temperatura nas amostras contribuiu para um acréscimo significativo nos teores de umidade a partir dos 6 meses (acima de 16%). Embora a refrigeração por si própria possa ser uma ferramenta de armazenamento útil, armazenar grãos durante longos períodos de tempo, sem uma forma de controlar a umidade, não é eficiente (CROFT et al., 2016).

4.1.4. Teor de proteína bruta

Com relação ao teor de proteína bruta (Figura 10), durante o armazenamento não houve queda significativa no teor de proteínas para os grãos mantidos em embalagens seladas à vácuo, o resfriamento também contribuiu para a manutenção do teor proteico, mesmo nos feijões com ausência de vácuo. A qualidade nutricional dos grãos de feijão apresentou melhor conservação para os grãos refrigerados conservando os teores de proteínas.

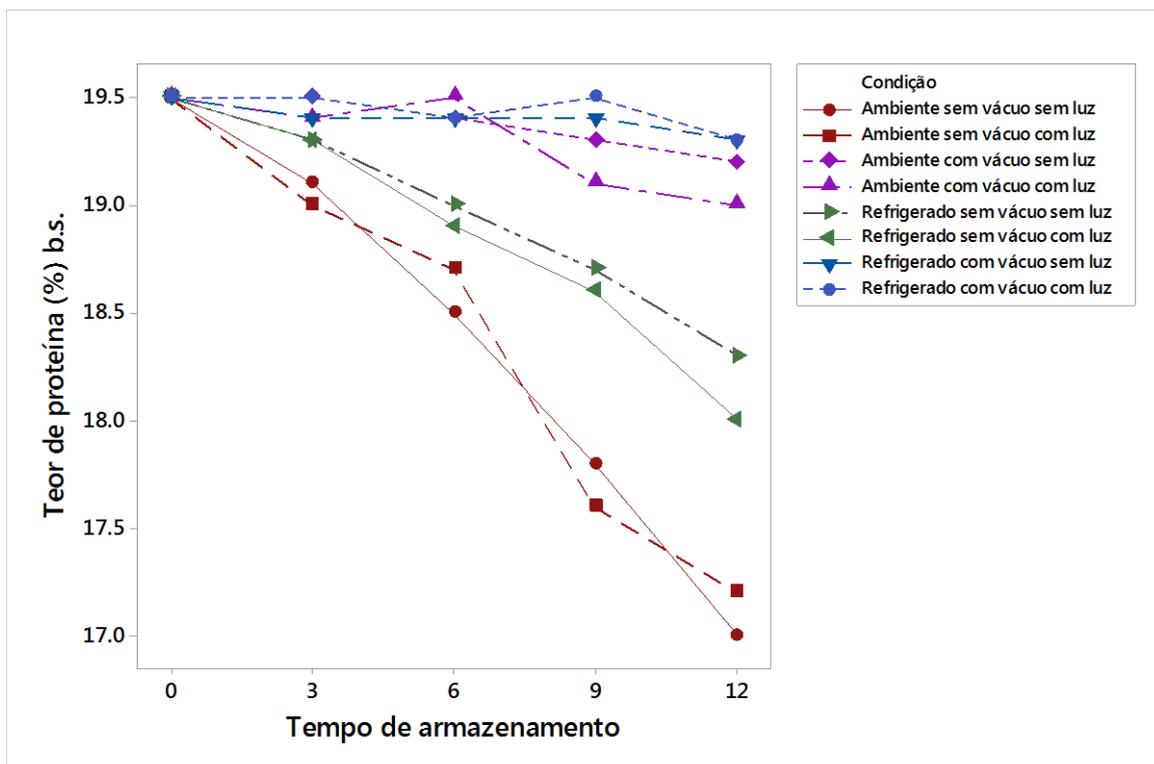


Figura 10. Teor de proteína bruta (%) em base seca, dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 4. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do teor de proteína bruta

Condição	Valor F	Pr > F
Luz	0,9	0,3769
Temperatura	98,6	0,0006
Vácuo	584	<,0001
Tempo	167,4	0,0001

*significativo a $p < 0,05$.

A partir dos 6 meses de armazenamento, as amostras em temperatura ambiente e as refrigeradas tiveram um decréscimo no teor de proteína bruta, com interações significativas entre o tempo e a condição de armazenamento ($p < 0,05$). Aos 12 meses o efeito da ausência de vácuo seguido da temperatura ambiente demonstrou maior redução das médias apresentando valores de proteína de 17%.

Temperaturas elevadas e armazenamento por tempo prolongado são fatores determinantes na queda da qualidade do produto, uma vez que estudos demonstram a queda dos níveis de proteínas para grãos, possivelmente relacionada a desaminação, reações de hidrólise, descarboxilação e complexação com outros componentes dos grãos (CHIDANANDA et al., 2014).

Os resultados encontrados indicam que o decréscimo no teor proteico pode influenciar no desenvolvimento do fenômeno “hard-to-cook”. A despolimerização da fração protéica para pequenos peptídeos e aminoácidos aromáticos têm sido relatados na literatura para desencadear esse fenômeno de dureza dos grãos ao cozinhá-los. Ocorre *crosslinking* de produtos derivados da hidrólise de proteínas com síntese de polifenóis, que migram para a lamela média durante o armazenamento e na presença de enzimas como a peroxidase, a lignina é formada, causando assim a o endurecimento dos grãos e conseqüentemente maior tempo de cocção (COELHO et al., 2007).

4.2. Parâmetros de qualidade tecnológica

4.2.1. Parâmetros de cor

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam as alterações ocorridas com a cor do tegumento ao longo do armazenamento em diferentes condições.

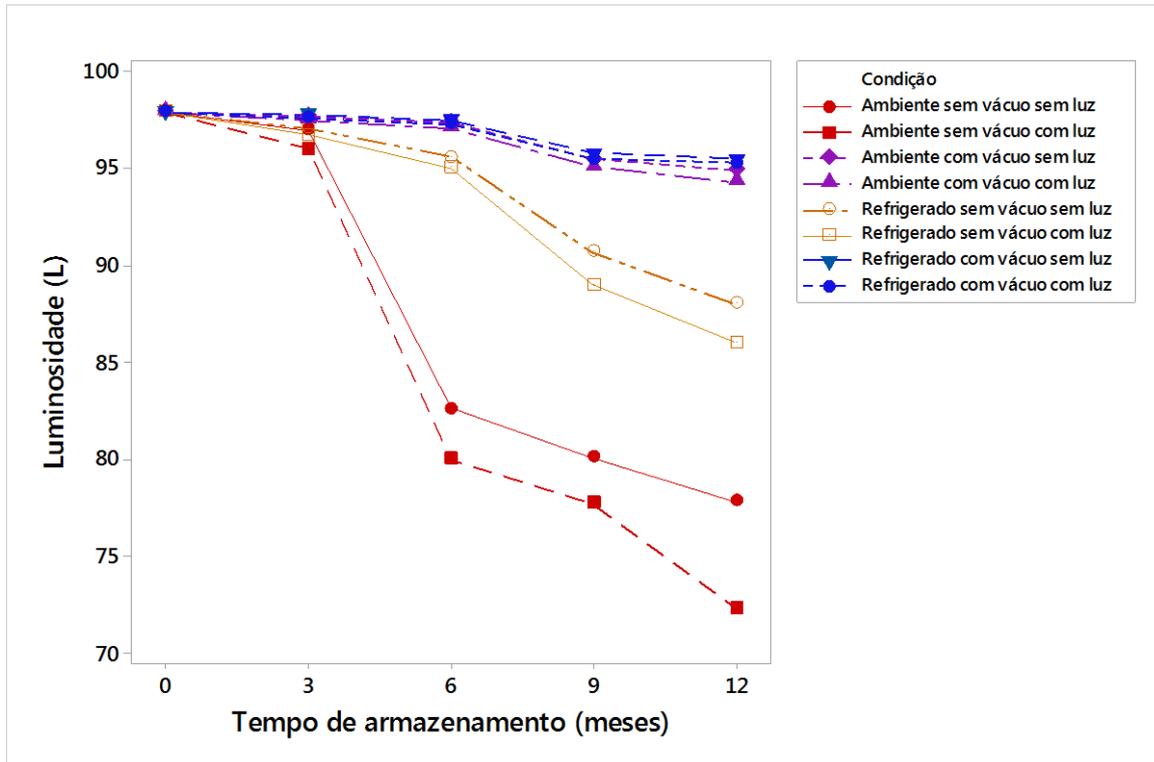


Figura 11. Luminosidade (L) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 5. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da luminosidade

Condição	Valor F	Pr > F
Luz	44,2	0,0026
Temperatura	766,5	<,0001
Vácuo	2515,1	<,0001
Tempo	774,6	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

Quanto à coordenada L^* , parâmetro este que indica a luminosidade, ou tendência à cor branca, podemos observar que houve alterações significativas entre os tratamentos. Todas as amostras escureceram ao longo do armazenamento, com maior ou menor intensidade. Aos 3 meses, as amostras à vácuo foram as que tiveram maiores valores de luminosidade, mantendo-se com esse comportamento até os 12 meses de armazenamento.

A presença de luz, variações de temperatura, tempo de armazenamento e ausência de vácuo foram fatores significativos em relação luminosidade dos grãos ($p < 0,05$), pois em todas as amostras sem vácuo os valores de L decresceram ao longo do armazenamento.

Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira et al. (2011) que, estudando a cultivar Pérola, verificaram diminuição na luminosidade (12%), após armazenamento refrigerado por seis meses sem embalagem a vácuo. Em várias classes comerciais de feijão, incluindo carioca, pinto e cranberry, a cor creme ou branco do tegumento muda lentamente para marrom escuro ou amarelo após a semente estar fisiologicamente madura. Estudos demonstraram que este escurecimento pós-colheita do tegumento ocorre mais rapidamente em ambientes com alta temperatura e umidade relativa do ar e presença de luz e oxigênio (BRACKMANN et al., 2002; JUNK-KNIEVEL, VANDENBERG & BETT, 2007).

A coordenada a^* indica variações de cor do vermelho ao verde, variação esta que pode ser observada ao longo do armazenamento (Figura 12).

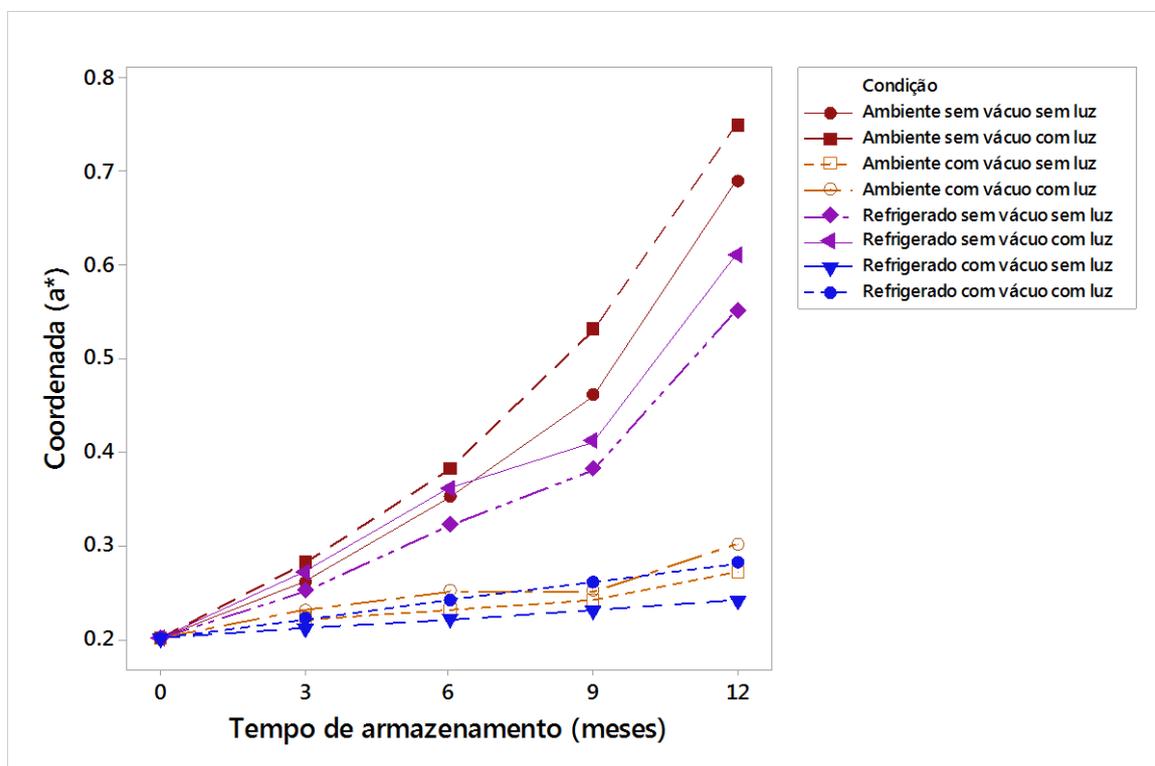


Figura 12. Coordenada (a^*) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 6. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da coordenada a^*

Condição	Valor F	Pr > F
Luz	64,9	0,0013
Temperatura	106,3	0,0005
Vácuo	2275,7	<,0001
Tempo	852,1	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

O valor inicial de +0,2 aumentou para um valor máximo de +0,75 aos 12 meses na amostra que ficou em temperatura ambiente com a presença de luz. Isso demonstrou que as variações de temperatura e presença de luz, alteraram a cor do tegumento do grão que tendeu ao tom avermelhado ($p < 0,05$).

Com relação a coordenada b^* os feijões da classe Branco, quando envelhecidos, normalmente apresentam uma mudança em sua cor visível, que varia do branco ao amarelo, portanto, a coordenada b^* ($+b =$ amarelo; $-b =$ azul) é um importante parâmetro de cor que indica o quanto esse grão sofreu alterações.

Em geral, todos os tratamentos sofreram acréscimos significativos para essa coordenada ($p < 0,05$), sendo que o resfriamento acompanhado do vácuo colaborou para que esse aumento fosse menor ao longo dos meses. A presença de oxigênio acelera as oxidações enzimáticas e, assim, o escurecimento do tegumento de feijões (IADEROZA et al., 1989).

A Figura 13 demonstra as variações que ocorreram nos feijões armazenados a temperatura ambiente e refrigerados durante 12 meses.

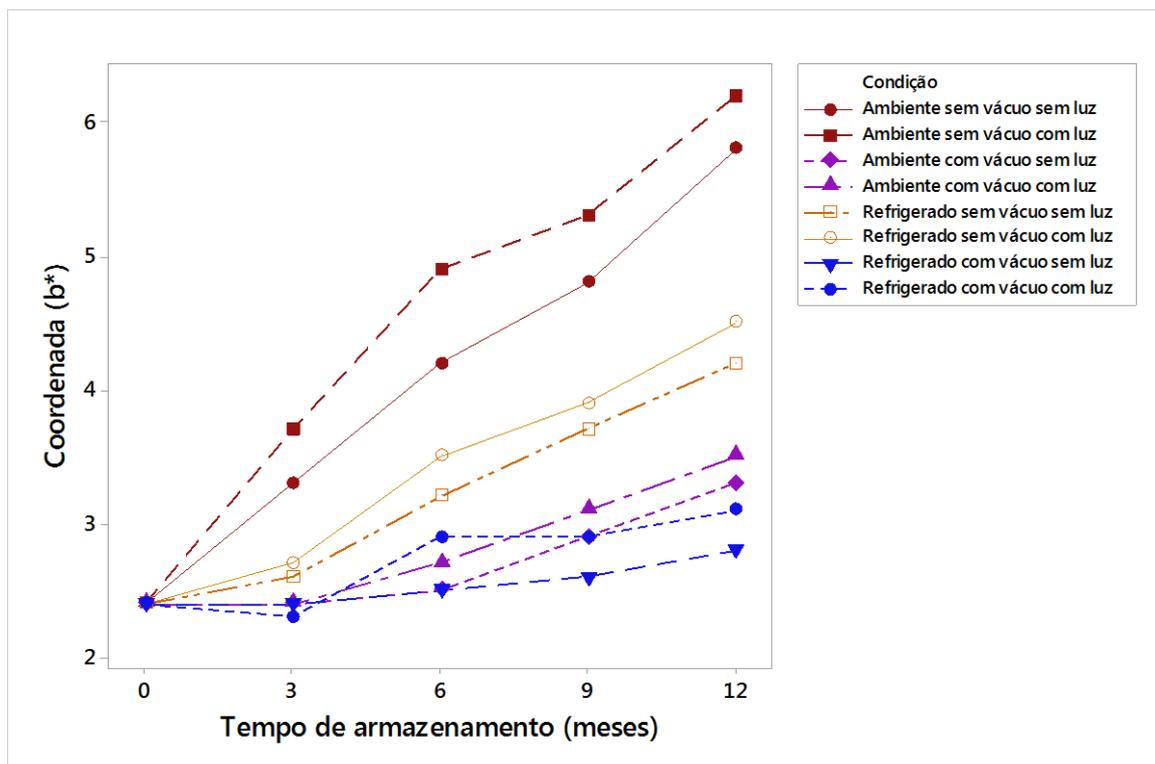


Figura 13. Coordenada (b^*) dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 7. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da coordenada b*

Condição	Valor F	Pr > F
Luz	74,4	0,0010
Temperatura	482,4	<,0001
Vácuo	1895,5	<,0001
Tempo	620,3	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

Os feijões armazenados sem vácuo, com variações na temperatura ambiente apresentaram os maiores aumentos no valor de b* (4,5 a 6,2). A este respeito, Junk-Knievel et al. (2007) reportaram que ao longo do tempo, linhagens de feijão com tegumento claro, aumentaram os valores de cromaticidade a* e b*, demonstrando que os grãos se tornam mais escuros e com mudança significativa de sua tonalidade inicial, numa tendência linear.

4.2.2. Tempo de cocção

Quanto ao tempo de cocção, as amostras não diferiram significativamente em decorrência da ausência ou presença de luz.

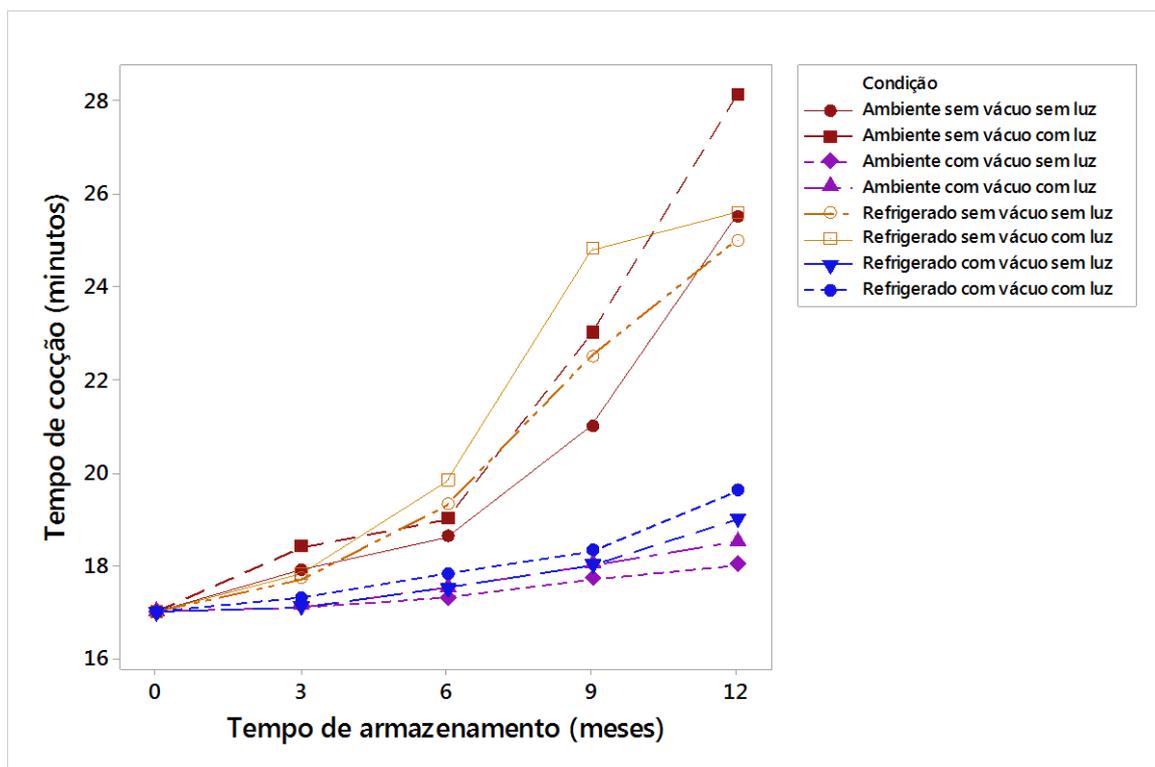


Figura 14. Tempo de cocção dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 8. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do tempo de cocção

Condição	Valor F	Pr > F
Luz	28	0.0661
Temperatura	4,1	0.0105
Vácuo	730,8	<.0001
Tempo	346,2	<.0001

*significativo a $p < 0,05$.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que o tempo de cocção dos grãos de feijão foi afetado tanto pela temperatura, controle da atmosfera da embalagem e pelo tempo de armazenamento ($p < 0,05$). Os grãos de feijão apresentaram inicialmente um tempo de cocção de 17 minutos, aos 3 meses de armazenamento já apresentaram um aumento no tempo de cocção, sendo intensificado com o aumento da temperatura. Quando os grãos foram armazenados sem presença de vácuo, verificou-se elevados tempos de cocção, com tempos de cocção superiores há 21 minutos.

Nos feijões embalados a vácuo, somente após 6 meses de armazenamento que o tempo de cocção aumentou significativamente ($p < 0,05$), o que pode ser explicado pela menor disponibilidade de oxigênio, no interior da embalagem selada a vácuo, impedindo a ação de enzimas e a formação de fenóis de alto peso molecular, responsáveis pelo endurecimento e escurecimento dos grãos (OLIVEIRA et al., 2011).

Resultados semelhantes foram encontrados por Paredes-López, Maza-Calviño e González-Castañeda (1989) que armazenaram grãos de feijão a 40°C por 135 dias e verificaram uma elevação de 6 vezes no tempo de cocção quando comparado com o tempo inicial.

4.2.3. Coeficiente de hidratação

A capacidade de absorção de água é um parâmetro importante na qualidade de grãos de feijão, pois indica a maior dureza dos grãos que está relacionada à dificuldade deles em absorver água durante o processo de cozimento, o que é resultado do defeito '*hard-to-cook*'.

O armazenamento em condições adversas tem um efeito definitivo para a alteração destas propriedades físicas dos grãos e a presença de oxigênio é uma destas condições que propiciam o aparecimento desse defeito (NJOROGÉ et al., 2014). Semelhante ao tempo de cocção, o coeficiente de hidratação apresentou

influência das condições em que foram submetidas as amostras, suas variações são apresentadas na Figura 15 e Tabela 9.

A embalagem a vácuo com ausência de luz permitiu melhor absorção de água dos grãos, principalmente nos refrigerados a 8°C, apresentando um coeficiente de 200,4 % no início do armazenamento, após 6 meses 198,5% e com médias significativamente maiores ($p < 0,05$) que as demais amostras aos 12 meses (195,3%). As amostras mantidas a temperatura ambiente com vácuo apresentaram igualmente redução na absorção de água após 9 meses (195,1%) e aos 12 meses (195%).

No entanto, os grãos armazenados sem controle da atmosfera da embalagem e com presença de luz, absorveram menos água, que conseqüentemente, afetou seu cozimento, como foi demonstrado anteriormente, com o aumento do tempo de cocção nesses feijões. Aos 12 meses de armazenamento as amostras com temperatura ambiente sem vácuo e presença de luz apresentaram um coeficiente de hidratação significativamente menor ($p < 0,05$), 140,8%.

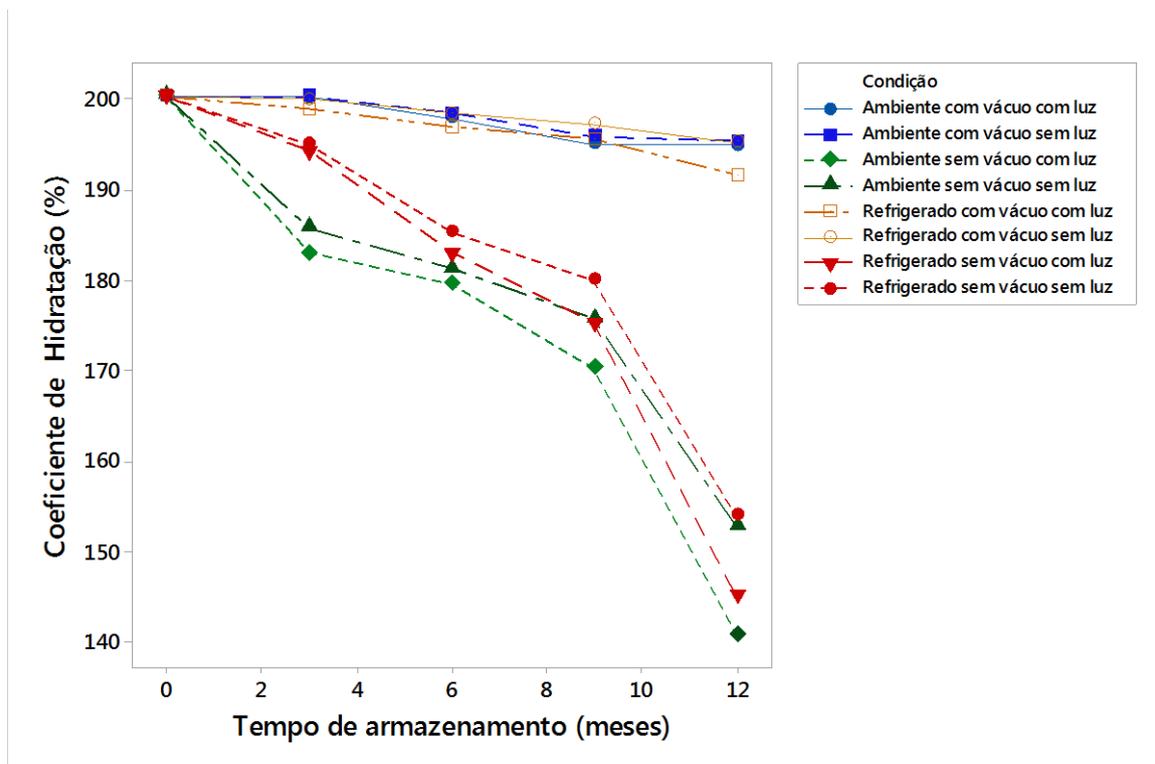


Figura 15. Coeficiente de hidratação dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 9. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação do coeficiente de hidratação

Condição	Valor F	Pr > F
Luz	73,9	0,0010
Temperatura	47,4	0,0023
Vácuo	4360,7	<,0001
Tempo	1233,8	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

A impermeabilização do tegumento e a redução do espaço intercelular (RODRIGUES, 2015) são apontadas como responsáveis pela redução da capacidade de absorção de água dos grãos. Dessa forma, quanto mais adversa for a condição de armazenamento, menor será a capacidade de hidratação e, logo, menor o coeficiente de hidratação.

4.3. Parâmetros nutricionais

4.3.1. Inibição da alfa amilase

A proteína faseolamina é dita como inibidora da enzima alfa-amilase. Essa enzima tem destaque no metabolismo de carboidratos em animais, em plantas e em outros organismos. Suplementos contendo inibidores de alfa-amilase foram comercializados como “bloqueadores de amido”, sendo utilizado para o controle do diabetes e também da obesidade (OCTÁVIO, 2002; QIAN, 2013; YAO et al., 2016).

Avaliando a inibição da alfa amilase presente no feijão branco, não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos feijões refrigerados armazenados à vácuo durante 12 meses, havendo interação significativa para a temperatura e tempo. No tempo zero o feijão branco foi capaz de inibir 84,3% da alfa-amilase, Ashouri et al. (2017) estudando o efeito da inibição da alfa-amilase em feijões Red Kidney detectou uma inibição de 69%.

O resfriamento foi efetivo, mesmo sem a presença de vácuo, em manter a qualidade dessa glicoproteína em inibir a alfa-amilase, mantendo-se com valores elevados após 12 meses. As amplitudes térmicas em que foram submetidos os feijões em temperatura ambiente, sem vácuo e com presença de luz promoveram uma queda bem acentuada nos valores de inibição de 84,3% inicial para 74,8% aos 12 meses, possivelmente devido à natureza termolábil da faseolamina. Na figura 16 a

porcentagem de inibição confirma o efeito da atmosfera controlada e do resfriamento na manutenção da faseolamina.

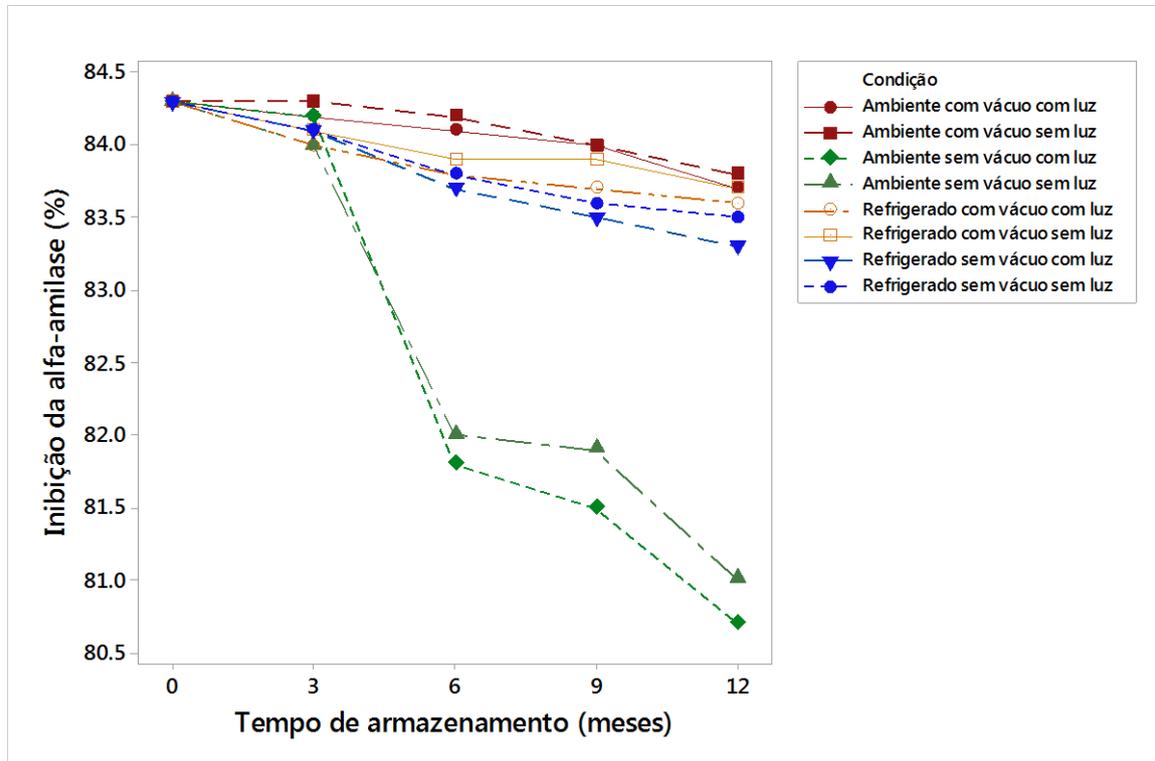


Figura 16. Inibição de alfa-amilase dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 10. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da inibição da alfa-amilase

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	11,1	0,0290
Temperatura	365,5	<,0001
Vácuo	817,5	<,0001
Tempo	341,4	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

A partir dos 9 meses de armazenamento as amostras refrigeradas sem vácuo inibiram significativamente menos ($p < 0,05$) que as amostras em temperatura ambiente embaladas à vácuo, não havendo influência significativa na presença ou ausência de luz.

Yao et al. (2016) caracterizou 41 genótipos de feijão, de diversas cores e países, e concluiu que existe uma considerável variação na atividade de inibição de

alfa-amilase, no entanto, a variedade com maior atividade foi de feijão da classe branco, com uma inibição de 87,3%. Wang et al. (2011) também observaram que a faseolamina extraída de feijão branco possui uma atividade inibitória muito maior quando comparada com feijões coloridos, devido sua maior concentração proteica por peso seco.

As amostras de feijão branco armazenadas por 12 meses sofreram perdas significativas como inibidoras da enzima alfa-amilase, principalmente aquelas armazenadas sem vácuo e esse fato pode implicar também em perdas na manutenção da qualidade proteica dessa glicoproteína.

4.3.2. Fenóis totais

Fenóis são os principais contribuintes para a cor do tegumento de grãos de feijão, bem como para a distribuição e intensidade dos pigmentos nele contidos (AMAROWICZ & SHAHIDI, 2017). Estes compostos são suscetíveis a mudanças de cor por meio de processos enzimáticos e não-enzimáticos. Neste sentido, a quantidade de fenóis é um parâmetro importante nos estudos relacionados ao escurecimento e ao endurecimento de feijões. O maior teor de fenóis totais foi nos feijões armazenados a 8°C, conforme mostra a Figura 17.

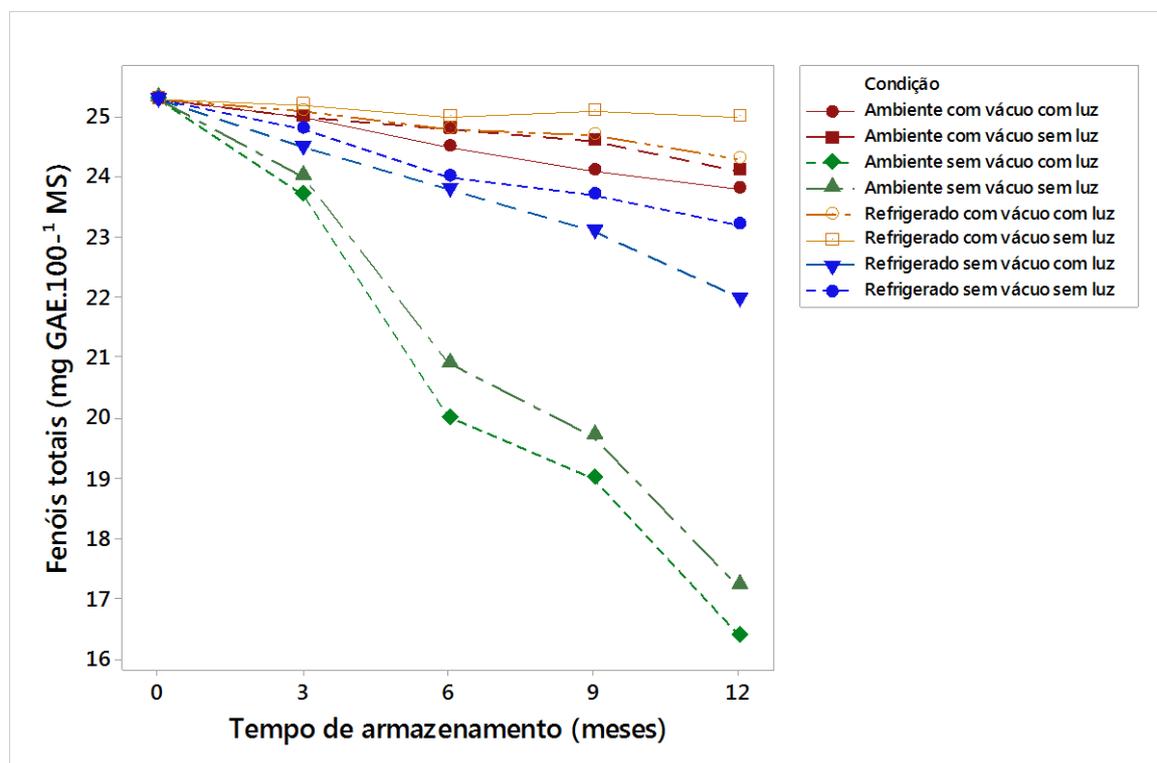


Figura 17. Fenóis totais dos grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 11. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação dos fenóis totais

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	165,4	0,0002
Temperatura	2918,3	<,0001
Vácuo	5982,3	<,0001
Tempo	1627,3	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

Ranilla et al. (2010) que avaliou o feijão branco “Saint Eloi” e verificou um teor de 8,89 (mg EAG. g^{-1}), mas esses teores são significativamente menores quando comparados com feijões preto e carioca. Esses feijões possuem variações de 13 a 50 (mg EAG. g^{-1}) segundo Campos-Vega (2010).

Analisando a Figura 17, apenas os feijões mantidos a 8°C tiveram menor decréscimo nos teores de fenóis totais, sendo significativo o vácuo e a presença de luz ($p < 0,05$), mantendo esse comportamento mesmo após 12 meses. As amostras armazenadas em temperatura ambiente à vácuo também apresentaram decréscimos nos teores de fenóis totais, com teores iniciais de 25,3 para 23,8 mg GAE.100 g^{-1} de matéria seca após 12 meses. Em grãos armazenados em temperatura ambiente sem vácuo, com presença de luz, observou-se uma notável redução ($p < 0,05$) no conteúdo total de compostos fenólicos no 12º mês comparando com o feijão recém-colhido (25,3 para 16,4mg GAE.100 g^{-1} de matéria seca)

Pode-se verificar que o tempo de armazenamento influencia esses compostos, segundo Nasar-Abbas et al (2008) durante o armazenamento de grãos, os compostos fenólicos são degradados e sintetizados a partir de moléculas de peso molecular menor, porém em temperaturas elevadas de armazenamento estes compostos são facilmente oxidados e podem ligar-se a proteínas formando complexos insolúveis. Segundo Acosta-Estrada et al. (2014), os compostos fenólicos possuem uma ótima reatividade com os componentes estruturais da parede celular, como celulose, hemicelulose, pectina e proteínas, que atuam como uma barreira física e química tornando os grãos resistentes ao cozimento.

4.4. Atividade enzimática

4.4.1. Superóxido dismutase (SOD)

As variações das condições de armazenamento dos grãos podem interferir diretamente na qualidade fisiológica causando alterações metabólicas degenerativas,

como endurecimento dos grãos, lixiviação de solutos, escurecimento e mudanças na atividade enzimática, fatores estes que caracterizam a deterioração dos grãos e, por consequência, acarretam perdas na qualidade nutricional.

A detecção da atividade de SOD, em grãos armazenados, sugere que durante armazenamento de grãos de feijão ocorre estresse oxidativo mediado por enzimas antioxidantes, dentre elas a SOD. Seus níveis aumentam durante o estresse em feijão (JEBARA et al., 2005). SOD é a primeira barreira contra EROs (espécies reativas de oxigênio) na célula. A Figura 18 apresenta os valores observados para a atividade de SOD em feijões brancos armazenados por um ano.

A embalagem a vácuo permitiu que as amostras tivessem uma menor atividade dessa enzima, pois a concentração de gases em seu interior é menor, com atividade respiratória mínima dos grãos. A influência significativa do resfriamento, mesmo com ausência de vácuo, não permitiu que os grãos fossem submetidos a tanto estresse quanto aqueles com flutuações de temperatura como os grãos armazenados em temperatura ambiente.

A presença de luz apresentou influência significativa ($p < 0,05$), assim como a temperatura e o tempo de armazenamento. Nas amostras refrigeradas sem vácuo foi possível observar atividade da enzima SOD de $45,1 \text{ U.mg}^{-1}$ de proteína nos grãos recém-colhidos, no entanto, após um ano, esse valor sofreu um acréscimo para $48,6 \text{ U.mg}^{-1}$ de proteína. Valores esses maiores quando comparados ($p < 0,05$) com aqueles feijões armazenados à vácuo em temperatura ambiente ($45,1$ no tempo 0 para 46 U.mg^{-1} de proteína no 12º mês).

Uma maior atividade de SOD, indica formação de EROs com consequente instalação de processos oxidativos, como por exemplo oxidação de compostos fenólicos, durante o armazenamento de grãos.

O balanço entre produção de EROS (atividade de SOD) e a degradação das mesmas é crucial em determinar a carga oxidativa do grão. Junk-Knievel et al. (2007) estudando feijões coloridos relataram valores maiores aos encontrados no presente estudo, esse fato ocorre normalmente em genótipos com grande suscetibilidade ao escurecimento e endurecimento.

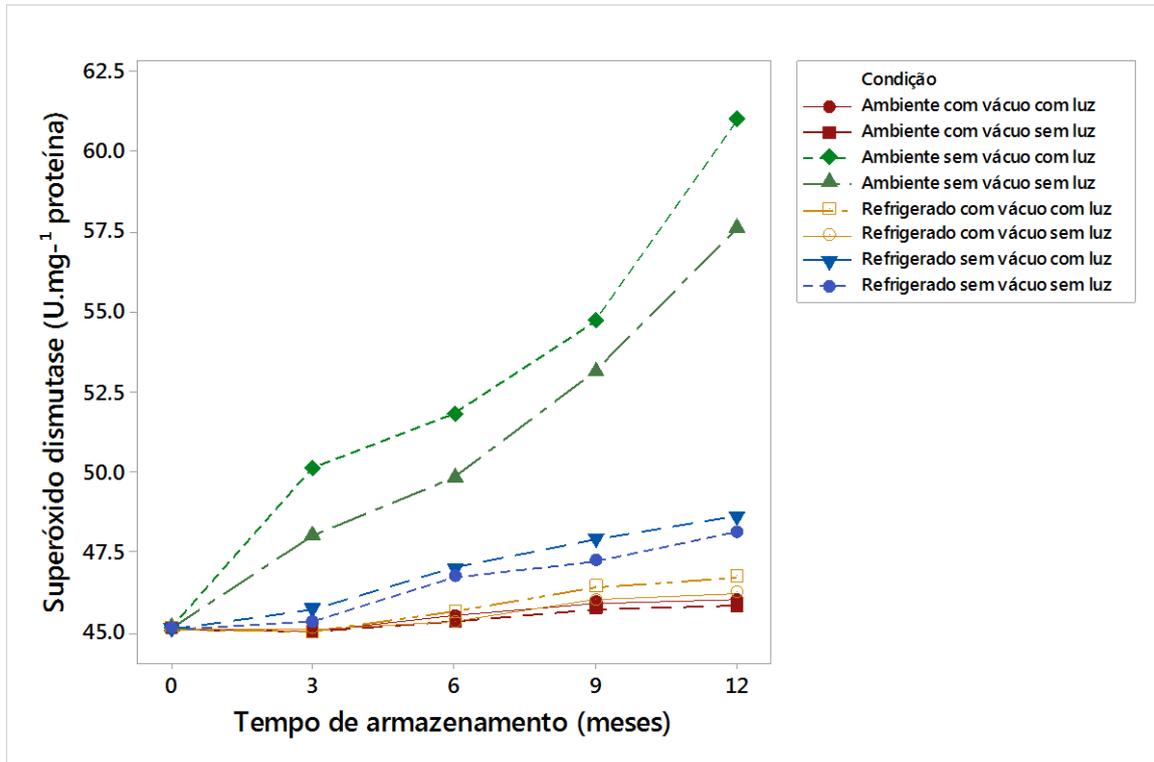


Figura 18. Atividade de superóxido dismutase em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 12. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de superóxido dismutase

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	23,9	0.0081
Temperatura	334,7	<.0001
Vácuo	771,2	<.0001
Tempo	173,3	<.0001

*significativo a $p < 0,05$.

O produto da atividade de SOD, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e seu acúmulo em excesso pode ser uma das principais consequências dos estresses abióticos que ocorrem durante o armazenamento de grãos. EROs são tóxicas quando produzidas em altas concentrações, mas em baixas concentrações, elas agem com um sinal de alerta para dar início às respostas preventivas contra a maioria dos fatores estressantes (ARA et al., 2013).

Apesar da atividade de superóxido dismutase não ser tão elevada, ela indica que esses grãos já estão sob efeito de condições adversas e consequentemente passível de degradação conforme aumenta o tempo de armazenamento.

4.4.2. Atividade da peroxidase

As enzimas peroxidases e polifeniloxidase são amplamente distribuídas na natureza e desempenham papéis importantes em numerosos processos metabólicos. Eles são responsáveis pelas várias reações de escurecimento em frutas, grãos e vegetais, e são fundamentais na degradação de compostos fenólicos na presença de oxigênio (ELIAS et al., 2016).

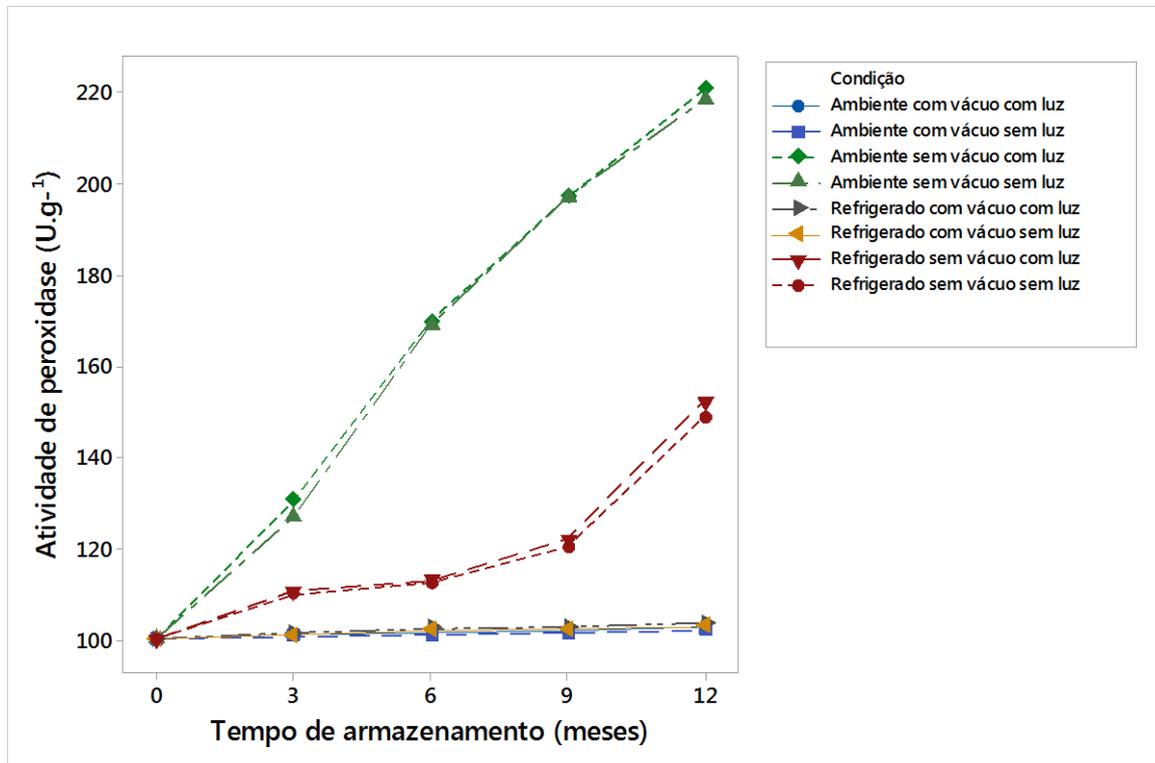


Figura 19. Atividade de peroxidase em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 13. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da atividade de peroxidase

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	16,4	0.0154
Temperatura	10367,2	<.0001
Vácuo	34080,2	<.0001
Tempo	5124,7	<.0001

*significativo a $p < 0,05$.

A atividade da enzima peroxidase (Figura 19), demonstra que mesmo após 12 meses de armazenamento, a atividade manteve-se em níveis mínimos nas amostras refrigeradas, entretanto, constatou-se ($p < 0,05$) que a temperatura ambiente provocou maior atividade dessa enzima.

As condições estabelecidas de tempo e temperatura apresentaram influência significativas ($p < 0,05$), sendo que, a presença de luz também foi um fator que influenciou na atividade da enzima peroxidase

Em relação aos tempos de armazenamento a atividade da enzima peroxidase aumentou no decorrer da armazenagem nas amostras sem vácuo. Similarmente tanto Rios et al. (2003) como Moura et al. (2005), após armazenamento de grãos de feijão das cultivares ESAL 550 (grãos amarelos), CI 12 (grãos bege com estrias), Carioca, CMGe H4, verificaram um aumento significativo na atividade da peroxidase no decorrer do armazenamento por 8 meses.

Pereira et al. (2014) detectou em grãos de café maior atividade enzimática da peroxidase e menor qualidade fisiológica desses grãos, revelando uma maior requisição da enzima frente ao evento deteriorativo. Bailly (2013), traçando o perfil eletroforético dessa enzima demonstrou que ela pode ser um indicador bioquímico da desnaturação dos grãos de café causada pela exposição prolongada a elevadas temperaturas. À medida que o estresse é mais intenso, a peroxidase mostra maior atividade, o que segundo Bailly (2013) evidencia sua tentativa de reparar os danos promovidos pelas EROS.

4.4.3. Atividade da polifenoloxidase

Um dos principais problemas que influenciam na qualidade de alimentos pouco processados (grãos) que ocorrem durante o armazenamento é o escurecimento enzimático. Polifenoloxidase (PFO) é a principal causa de escurecimento enzimático em plantas superiores. A reação é consequência da oxidação de compostos fenólicos pela PFO, que desencadeia a geração de pigmentos escuros (REDONDO et al., 2016). Isto é particularmente relevante para as leguminosas, que são ricas em polifenóis e altamente suscetíveis ao escurecimento enzimático, causando uma diminuição no teor de polifenóis e consequente redução da qualidade nutracêutica (CHEN et al., 2017).

Através da apresentação dos dados da atividade da enzima polifenoloxidase na Figura 20 podemos inferir que, por se tratar de uma enzima influenciada pela presença de oxigênio, as amostras que realizaram trocas gasosas com o meio foram as mais suscetíveis ao aumento dessa atividade.

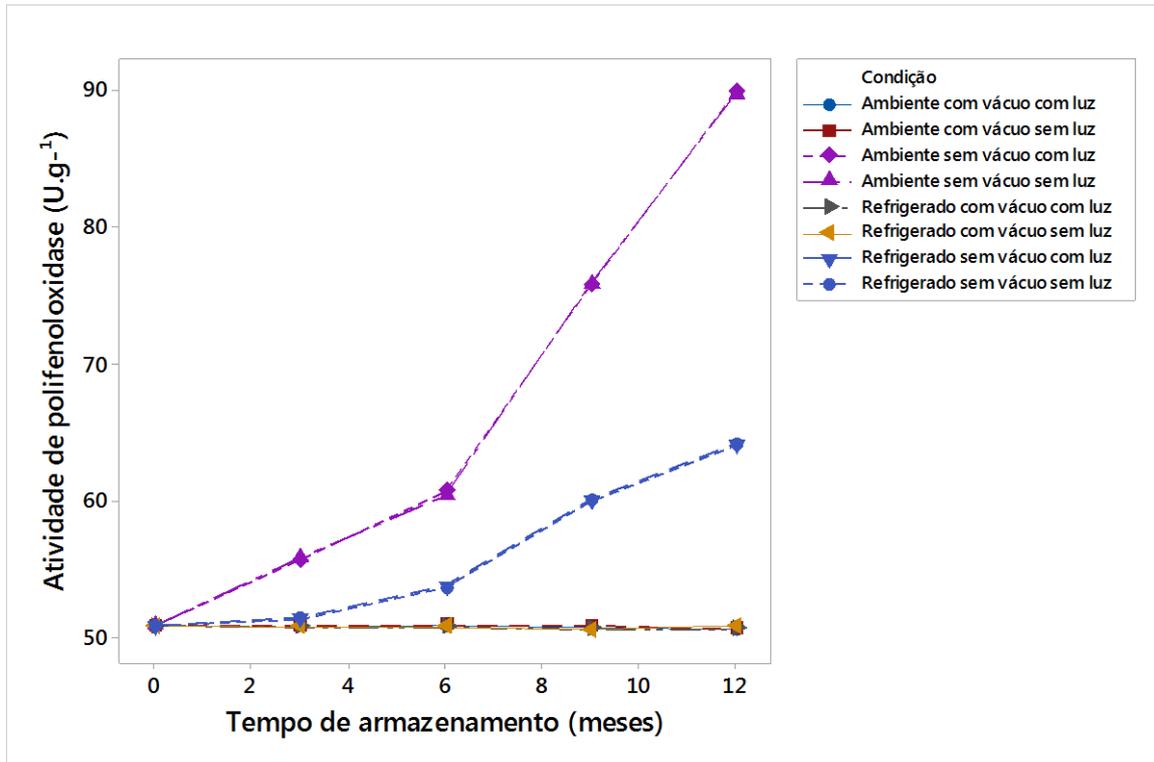


Figura 20. Atividade de polifenoloxidase em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 14. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da atividade de polifenoloxidase

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	0,1	0,0040
Temperatura	416,7	<,0001
Vácuo	1851	<,0001
Tempo	323,8	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

No início do armazenamento, o feijão Branco Chileno apresentou $50,8 \text{ U.g}^{-1}$ de atividade da enzima polifenoloxidase, após 12 meses as amostras resfriadas embaladas à vácuo não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). No entanto, as amostras que foram mantidas sem vácuo apresentaram um acréscimo na atividade enzimática ($50,8$ para $89,9 \text{ U.g}^{-1}$). Tal resultado também foi obtido por Moura et al. (2005) em que observaram uma atividade da polifenoloxidase durante o armazenamento em condições ambientais por 8 meses. Segundo Anterola e Lewis (2012), maiores atividades de peroxidase resultam em reforço da parede celular, que pode ser devida à deposição de lignina.

A atividade da enzima polifenoloxidase aumentou no decorrer do armazenamento para todas as condições utilizadas sem vácuo, mas as amostras

refrigeradas tiveram a atividade enzimática menos pronunciada após 12 meses (64,1U.g⁻¹).

Da mesma forma, Rani et al. (2013) encontraram atividade dessa enzima na cultivar 'pinto beans' durante o período de armazenamento por 360 dias. O defeito "hard-to-cook" tem sido atribuído a mudanças físicas e químicas que ocorrem entre as células durante a estocagem, resultando em um aumento na estabilidade da lamela média frente ao cozimento. Tem-se sugerido a contribuição de reações enzimáticas ao endurecimento, as quais incluem a oxidação de polifenóis por peroxidases ou polifenoloxidasas, a remoção de grupos metil das pectinas pelas pectinesterases, hidrólise de proteínas por proteases, e em menor proporção, oxidação de lipídios por lipoxigenases (YOUSIF, 2013).

Segundo Varriano-Marston e Jackson (2001) estas enzimas também interferem no endurecimento do grão. Estes verificaram que feijões envelhecidos apresentavam várias alterações estruturais e perda da integridade da membrana celular, afirmando também que estas alterações poderiam estar associadas com alterações bioquímicas provocadas pela ativação de diversas enzimas, entre elas a polifenoloxidase e a peroxidase.

4.5. Antinutricionais

4.5.1. Taninos totais

Os taninos possuem a capacidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (SINGH et al., 2017). Taninos são compostos fenólicos solúveis em água, com habilidade para precipitarem proteína, com alto peso molecular, que contém suficientes grupos hidroxila fenólica, para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas.

Os resultados apresentados na Figura 21 mostram o conteúdo de taninos totais nas amostras de feijão branco armazenados por 12 meses em diferentes condições.

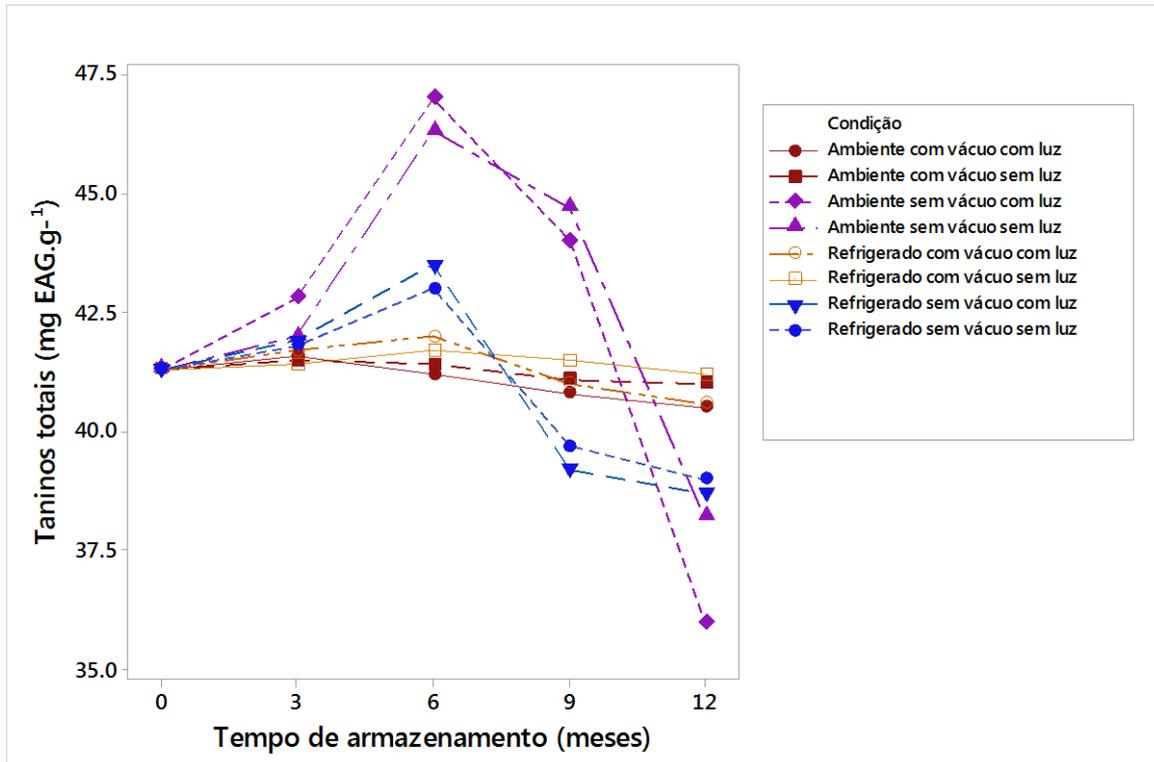


Figura 21. Taninos totais em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 15. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de taninos totais

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	1,3	0,3098
Temperatura	22,3	0,0091
Vácuo	8,6	0,0422
Tempo	91,9	0,0003

*significativo a $p < 0,05$.

Os conteúdos de metabólitos secundários avaliados neste experimento apresentaram variações durante o armazenamento, seguindo um mesmo comportamento e apresentando reduções semelhantes entre si, sendo afetados pela temperatura, atmosfera controlada e tempo de armazenamento.

Os teores de taninos totais apresentaram valores iniciais de 41,3 mg EAG.g⁻¹ que estão de acordo com a literatura, Campos-Veja et al. (2010) relataram valores semelhantes de taninos totais (34 a 58 mg EAG.g⁻¹). Os resultados apresentados na Figura 20 indicam que os níveis de taninos dos grãos permaneceram estáveis até o 3º mês de armazenamento. Reduções significativas ($p < 0,05$) ocorreram somente após 180 dias, com uma variação de 13% no final do armazenamento nas amostras em temperatura ambiente sem vácuo.

Aos 6 meses de armazenamento percebe-se que há um aumento no teor de taninos totais (47 mg EAG.g⁻¹) quando não há uso de vácuo, no entanto, nos feijões refrigerados a degradação dos compostos foi menos pronunciada (p<0,05). Estudos de Ferreira et al. (2004) sobre o feijão-guandu mostrou comportamento semelhante, com um ligeiro aumento no teor de tanino após 30 dias de armazenamento, e uma redução significativa após 60 e 90 dias. Tal comportamento é explicado pela presença de taninos de alto peso molecular com grupos hidroxila capazes de formar ligações estáveis com as proteínas (NASAR-ABBAS et al., 2008). Além disso, os taninos podem migrar do revestimento da semente para os cotilédones, formando ligações cruzadas com macromoléculas celulares dentro das paredes celulares ou na lamela média durante o armazenamento. Taninos podem até sofrer oxidação por enzimas, como peroxidase e polifenoxidase (DÍAZ et al., 2010).

Segundo Nasar-Abbas et al. (2008) durante o armazenamento de grãos, os compostos fenólicos são degradados e sintetizados a partir de moléculas de peso molecular menor, porém em temperaturas elevadas de armazenamento estes compostos são facilmente oxidados e podem ligar-se a proteínas formando complexos insolúveis.

Os grãos armazenados em embalagens a vácuo apresentaram a menor queda nos valores de taninos, indicando que o processo de oxidação foi mais lento, ao contrário daquelas amostras submetidas às oscilações de temperatura e a ausência de vácuo. Essas alterações que acontecem nos taninos contribuem para alterações físicas nos grãos. As altas temperaturas, as condições de umidade relativa alta e o tempo prolongado de armazenamento provocam o defeito conhecido como “hard-to-cook”.

4.5.2. Digestibilidade proteica

A digestibilidade é um parâmetro nutricional utilizado para avaliar o aproveitamento de uma fonte proteica e, no caso de feijões é influenciada por inibidores de enzimas digestivas, hemaglutininas e outros antinutricionais, presentes em quantidades variadas entre as cultivares, o que gera valores diferentes de digestibilidade entre as espécies de feijão e, dentro de uma mesma espécie, diferenças de uma cultivar para outra (NTATSI et al., 2018).

Os valores da digestibilidade proteica *in vitro* são apresentados na Figura 22.

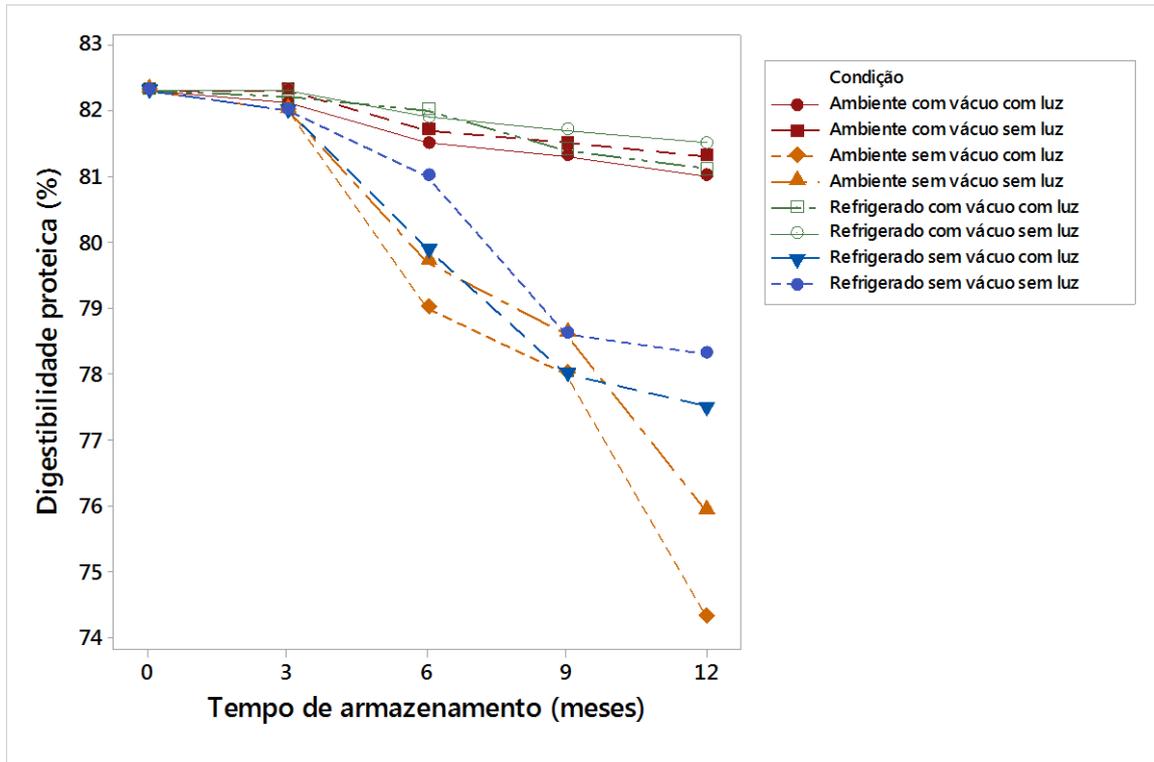


Figura 22. Digestibilidade proteica (%) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 16. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de digestibilidade proteica

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	29,8	0,0054
Temperatura	51,6	0,0020
Vácuo	975,6	<,0001
Tempo	417,5	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

Conforme podemos observar, houveram reduções constantes na digestibilidade de proteínas ao longo do armazenamento, sendo mais acentuadas naquelas amostras sem a presença de vácuo, com decréscimos em torno de 10% nas amostras armazenadas à temperatura ambiente. Quanto a presença de luz, esta somente influenciou a partir dos 6 meses, nas amostras sem vácuo ($p < 0,05$). Os feijões refrigerados apresentaram valores iniciais de 82,3% e após 12 meses houve uma redução significativa para 81,1%. As amostras mantidas à vácuo em temperatura ambiente e refrigeradas não diferiram significativamente ($p < 0,05$) após um ano de armazenagem, o que comprovou que o uso da embalagem selada à vácuo foi eficiente manter os teores de digestibilidade proteica elevados.

Rios et al. (2013) estudaram o efeito do armazenamento sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais do feijão, o armazenamento leva a menor digestibilidade e absorção de água. Por outro lado, Akillioglu e Karakaya (2009) afirmam que o cozimento aumenta a digestibilidade dos grãos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Segundo Akillioglu e Karakaya (2009) a digestibilidade parece ser um importante fator para potencializar a atividade antioxidante do feijão, já que ela influencia na liberação de polifenóis após a digestão de proteínas e amido.

Linsberger-Martin (2013) reportaram valores de 85,8% feijão comum submetido à cocção. Os valores de digestibilidade proteica *in vitro* foram próximos aos obtidos por Díaz-Batalla (2006), mas diferentes de Delfino e Canniatti-Brazaca (2010) que ao estudarem feijões da cultivar Pérola encontraram valores que variaram de 92,27 a 97,86%, valores estes superiores ao presente estudo, essas diferenças se devem principalmente as características agrônômicas de cada cultivar e possivelmente pela quantidade de polifenóis presentes em cada variedade. Os resultados obtidos em estudo de Oliveira (2011) mostraram que os métodos de processamento de feijão influenciam no teor de fatores antinutricionais e na sua digestão.

A reduzida digestibilidade das proteínas dos feijões e de outras leguminosas está relacionada à ação de fatores ligados a casca (taninos), aos cotilédones (proteínas, taninos, fitatos) e ao armazenamento, podendo-se dizer que o problema está centrado nas moléculas proteicas, como elas interagem entre si e com outros componentes, e como essas interações ocorrem no armazenamento e no processamento industrial (NTATSI et al., 2018).

4.5.3. Teor de ácido fítico

Entre os fatores antinutricionais mais citados para o feijão, está o conteúdo de ácido fítico. Sua ação está baseada na capacidade de formar complexos insolúveis com minerais, proteínas e amidos biologicamente indisponíveis. Entretanto, o ácido fítico, quando em baixas concentrações, apresenta também efeitos positivos sobre a saúde como ação protetora frente ao câncer e prevenção de enfermidades cardiovasculares (MARTINES-DOMINGUES et al., 2011).

Devido seu efeito significativo nos grãos de feijão, suas concentrações foram avaliadas quanto ao efeito que o armazenamento exerce sobre esse composto. O teor de ácido fítico está representado na Figura 23.

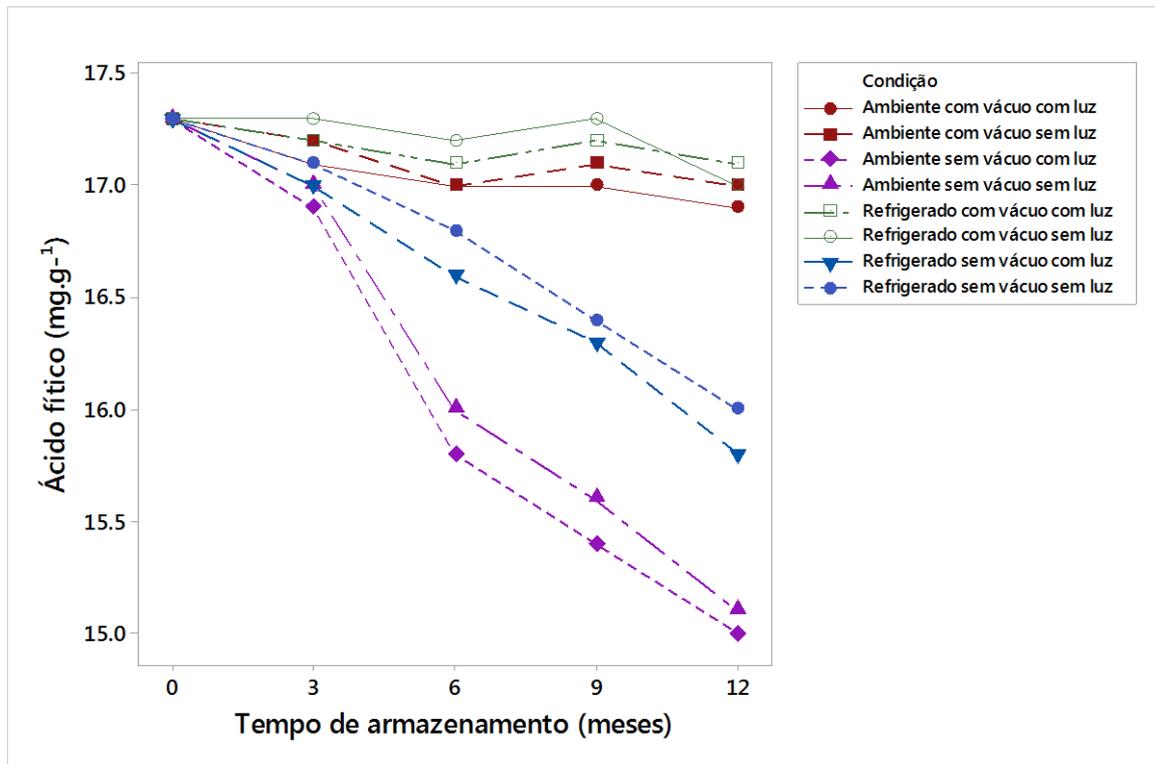


Figura 23. Ácido fóico em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 17. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação de ácido fóico

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	21,4	0,0098
Temperatura	294	<,0001
Vácuo	1644,5	<,0001
Tempo	435	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

No início do armazenamento, os valores iniciais de ácido fóico foram de 17,3 (mg de ácido fóico.g⁻¹) havendo uma redução significativa somente após 6 meses de armazenamento nas amostras embaladas sem a presença de vácuo, apresentando valores em média de 16,6 a 15,8 mg de ácido fóico.g⁻¹, nas amostras embaladas a vácuo os teores variaram significativamente ($p < 0,05$) devido a influência da temperatura.

Observou-se maiores reduções no teor de ácido fóico nas amostras armazenadas em temperatura ambiente sem vácuo (15,0 mg de ácido fóico.g⁻¹) após 12 meses.

Lásztity (2010) reportou valores de ácido fítico em diversos grãos, inclusive feijão, de 9,0 a 55,3 (mg de ácido fítico.g⁻¹) e Wang et al. (2011) descreveu dez variedades de feijão verificando valores de 9,9 a 14,1 (mg de ácido fítico.g⁻¹).

O tempo de armazenamento teve influência nos teores, Hong e Chang (2003), trabalhando com o armazenamento de grãos de soja, com alta umidade relativa do ar e 30°C de temperatura, encontraram inicialmente 13,32 (mg de ácido fítico.g⁻¹) com redução para 8,72 (mg de ácido fítico.g⁻¹) aos 9 meses.

Os fitatos se decompõem durante o armazenamento de feijão comum, e é um parâmetro importante no desenvolvimento do fenômeno “hard-to-cook”. Tal fato correlaciona a queda dos teores de fitatos nas amostras mantidas em temperatura ambiente sem vácuo com o seu maior tempo de cocção.

A diminuição nos teores de ácido fítico durante o tempo de armazenamento, pode ser explicada pela hidrólise enzimática da fitase endógena, que é acelerada por altas temperaturas e umidade relativa do ar (acima de 25°C e 65%), produzindo moléculas de trifosfato durante o processo de degradação dos grãos (REDDY, 1989).

4.5.4. Inibição de tripsina

Os inibidores de proteases são, na sua maioria, proteínas de ampla distribuição no reino vegetal, capazes de inibir as atividades das enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases. Entre os inibidores de proteases, os da tripsina são os mais amplamente estudados (COSCUETA et al., 2017).

De acordo com a Figura 24, aos 3 meses de armazenamento as amostras não diferiram significativamente ($p < 0,05$), no entanto, os teores de inibição não foram mantidos após 6 meses. As amostras que apresentaram maiores reduções foram aquelas armazenadas sem vácuo, variando de 0,17 a 0,15 mg.g⁻¹ após 12 meses. O refrigeração com vácuo (0,21 mg.g⁻¹) dos feijões não apresentou diferença significativa quando comparado ($p < 0,05$) com as amostras mantidas à temperatura ambiente também embaladas à vácuo após 12 meses (0,19 mg.g⁻¹).

Os resultados apresentados demonstram que o feijão Branco Chileno tem uma atividade inibitória bem abaixo do reportado por outros autores, sendo esta uma característica desejável, Wang et al. (2010) e Ávila et al. (2017) indicaram para o feijão Windsor White (branco) valores de 0,83 a 4,2 mg.g⁻¹, cranberry (branco com estrias vermelhas) valores entre 0,81 e 0,94 mg.g⁻¹ e para o feijão red kidney (vermelho) valores de 1,22 a 1,02 mg.g⁻¹.

A diminuição nos valores das amostras submetidas a variações de temperatura e umidade possivelmente seja explicado pela natureza química dessa enzima, as quais modificam sua estrutura espacial, deixando de atuar quando submetida ao aumento de temperatura. Nesse caso, a temperatura de cozimento, a temperatura de armazenamento, associado ao tempo de armazenamento e as variações de umidade relativa do ar (nas amostras sem vácuo) podem ter contribuído para essa redução, já que essa enzima também é melhor inativada na presença de calor úmido (LINSBERGER-MARTIN et al., 2013).

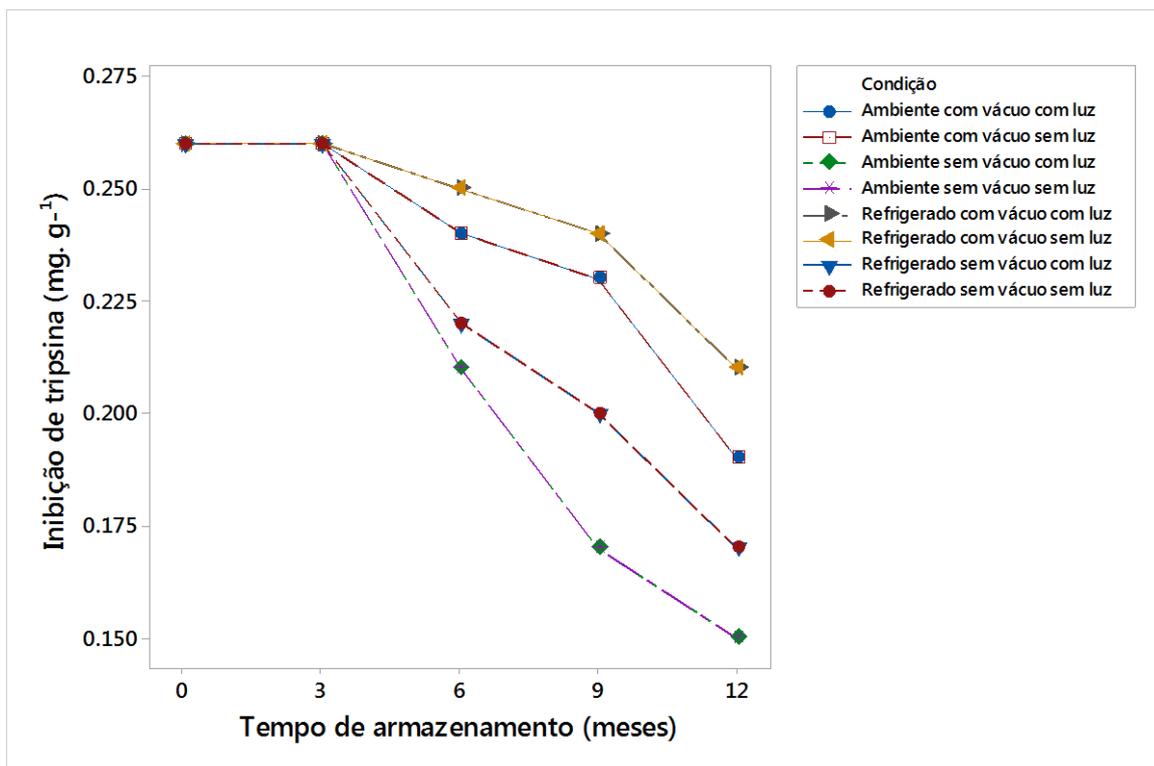


Figura 24. Inibição de tripsina (mg.g^{-1}) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 18. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da inibição de tripsina

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	24,98	0,0875
Temperatura	29,8	<,0001
Vácuo	644,5	<,0001
Tempo	35,8	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

4.5.5. Oligossacarídeos

Além dos carboidratos componentes da fibra e dos carboidratos digeríveis (amido e sacarose), encontram-se no feijão oligossacarídeos (rafinose, estaquiose, verbascose), os quais são os principais responsáveis pela produção de gases e desconforto intestinal.

Na maioria dos grãos, os oligossacarídeos da família rafinose são o segundo tipo de carboidrato solúvel mais abundante e contribuem com 1 a 12% da matéria seca. Eles são sintetizados e depositados nos órgãos de armazenamento, como as sementes e os tubérculos, durante o processo de maturação e são mobilizados durante os primeiros estágios da germinação (NTATSI et al., 2018).

O teor de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) variou ao longo do armazenamento. Os teores de rafinose e estaquiose são apresentados nas Figuras 25 e 26.

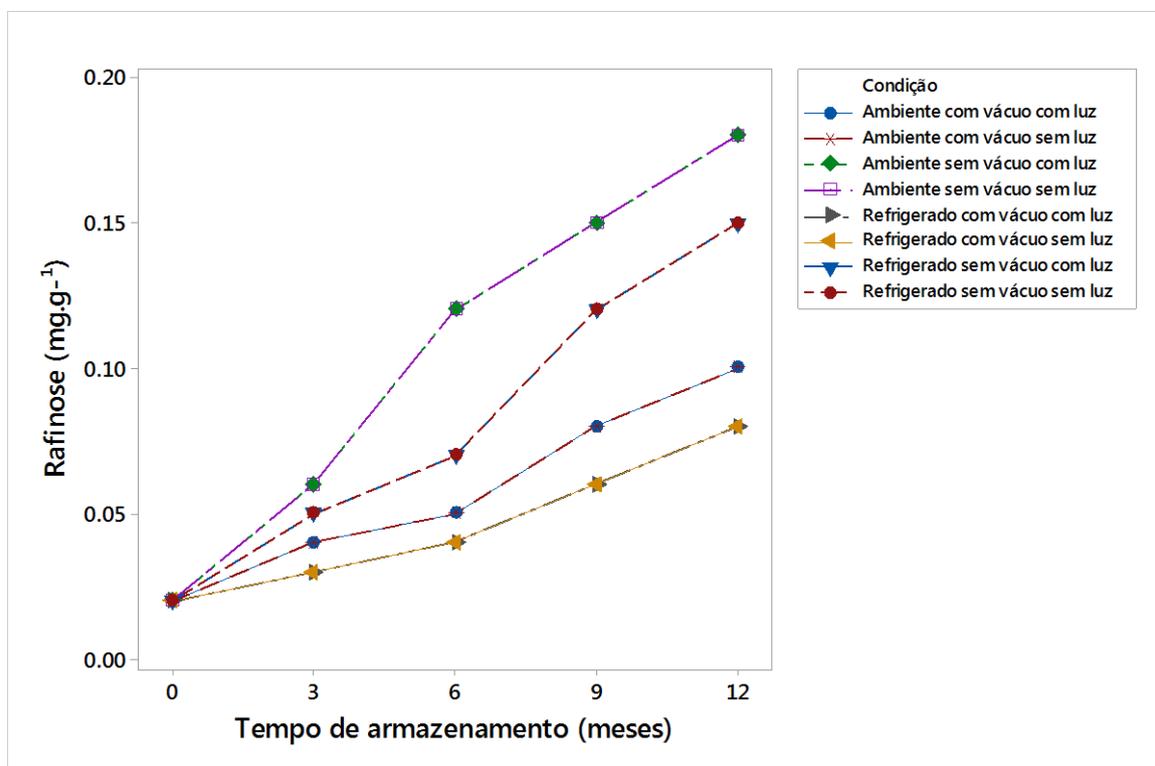


Figura 25. Rafinose (mg.g^{-1}) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 19. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da rafinose

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	14,1	0,0125
Temperatura	126,5	0,0004
Vácuo	49,7	0,0011
Tempo	384	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

Pode-se observar que não houve influência da presença de luz no conteúdo de rafinose nas amostras armazenadas, no entanto, a temperatura e o tempo tiveram ação nesse parâmetro.

Os feijões no início do armazenamento apresentaram $0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ de rafinose e após um ano tiveram um incremento desse teor, nos feijões armazenados por um ano, a 8°C selados à vácuo os valores encontrados foram de $0,08 \text{ mg.g}^{-1}$ de rafinose e os feijões não embalados à vácuo foi de $0,015 \text{ mg.g}^{-1}$. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas quando comparamos os feijões mantidos em temperatura ambiente sem vácuo, em que houve um aumento progressivo de rafinose a partir do terceiro mês, obtendo um valor máximo aos 12 meses de $0,18 \text{ mg.g}^{-1}$.

Quanto ao teor de estaquiose, o comportamento semelhante foi constatado na Figura 26.

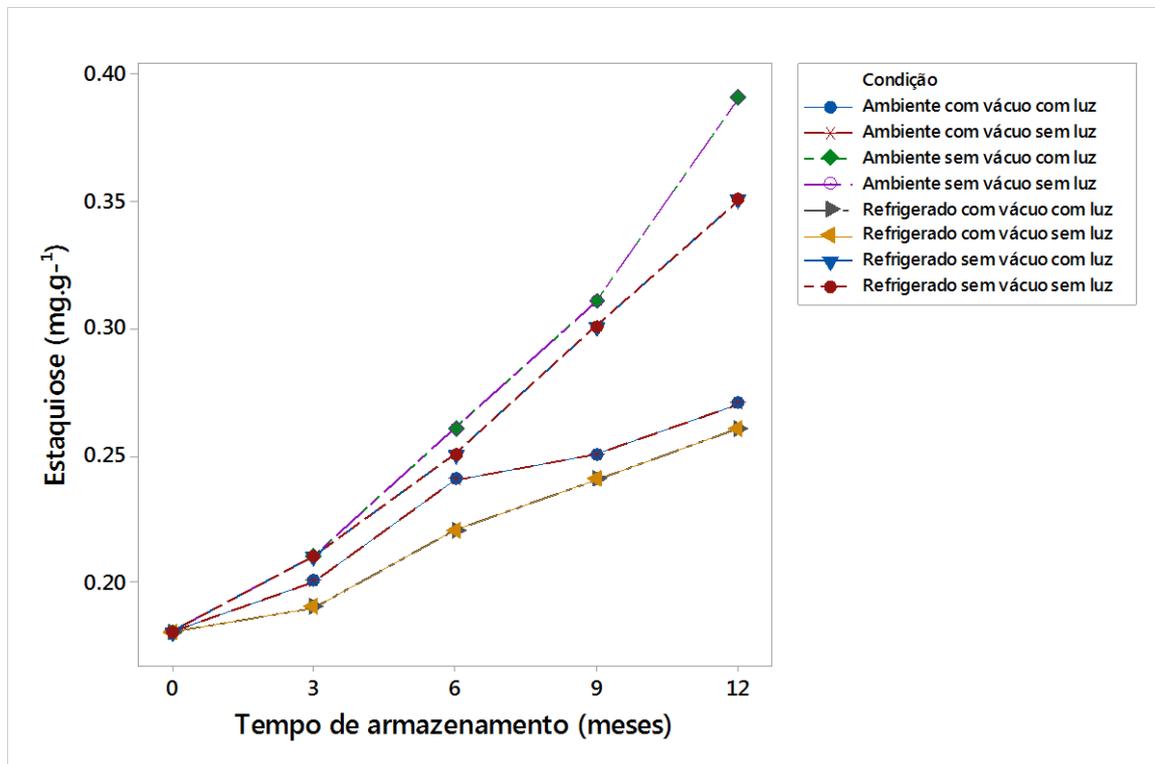


Figura 26. Estaquiose (mg.g^{-1}) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 20. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da estaquiose

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	28,1	0,0326
Temperatura	27,5	0,0114
Vácuo	79,7	0,0010
Tempo	483	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

Normalmente o teor de estaquiase é maior que o da rafinose em sementes (NTATSI et al., 2018). Ávila et al. (2017) em estudos com feijões do tipo cranberry e red kidney relataram valores de rafinose de $0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ e de estaquiase $0,21 \text{ mg.g}^{-1}$.

O aumento no teor de estaquiase foi detectado a partir dos 3 meses de armazenamento em todas as amostras, apresentando valores máximos de $0,39 \text{ mg.g}^{-1}$ após 12 meses nos feijões mantidos à temperatura ambiente não embalados à vácuo.

Os oligossacarídeos do grupo Rafinose são sintetizados durante a formação das sementes e hidrolisados durante o processo de germinação. A reação inicial é catalisada pela galactinol sintase (GS), em folhas e sementes, a atividade de GS correlaciona-se positivamente com os níveis de oligossacarídeos da série da rafinose.

A GS é induzida e tem sua atividade aumentada quando as plantas são submetidas a baixas temperaturas ou quando as sementes maduras iniciam o processo de perda de água, no final do desenvolvimento. Com a perda de água, que ocorre nas sementes durante a maturação, há concomitante aumento na concentração de oligossacarídeos (ZHAO et al., 2017). Além disso, o conteúdo de açúcares solúveis também sofrem influência do aumento da temperatura, havendo um acréscimo no conteúdo de rafinose e estaquiase e diminuição no conteúdo de glicose. Sabe-se que a combinação de açúcares pode propiciar uma melhor proteção às células do que no açúcar isoladamente. A sacarose, quando concentrada, não é estável e tende a cristalizar, a presença da rafinose previne essa cristalização e fornece melhor proteção às células que a sacarose sozinha (JOSÉ, PINHO & DIAS, 2006).

Ao final do armazenamento, houve aumento do teor de oligossacarídeos em todos os tratamentos, entretanto, os grãos embalados à vácuo obtiveram menor aumento, o que pode ser explicado pela menor disponibilidade de oxigênio, no interior da embalagem selada a vácuo, retardando a ação de enzimas GS.

4.5.6. Lignina

A lignificação é um processo bioquímico que abrange desde a formação dos monolignóis até a polimerização da lignina na parede celular. Além do apoio ao sistema estrutural da parede celular, defesa física e química, a lignina participa no processo de transporte de água no floema vascular e nas células do xilema, além

desses processos, o acúmulo de lignina durante o armazenamento afeta o sabor e a textura dos grãos (NASAR-ABBAS, 2008).

Conforme a Figura 27, podemos observar que o teor de lignina aumentou com o tempo de armazenamento. Todos os feijões apresentaram acréscimo significativo ($p < 0,05$) no teor após 3 meses. Os resultados indicam que as amostras refrigeradas armazenadas à vácuo variaram de $0,13 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ no período inicial a $0,23 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ após 12 meses e os feijões que não foram embalados à vácuo apresentaram teores de $0,42 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ após um ano.

Com relação ao efeito do tempo combinado com a temperatura e luz sobre os teores de lignina, verificou-se que estes agiram progressivamente, conforme observou-se nas amostras mantidas a temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz ($0,63 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ após 12 meses), e com vácuo ($0,26 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$). Os resultados são compatíveis com a literatura, Mambrin et al. (2015) verificaram teores de lignina com variações de $0,56$ a $1,70 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ em feijões.

Esse aumento no teor de lignina é considerado problemático para feijões armazenados, pois desencadeia o defeito “hard-to-cook” e como citado por Chigwedere et al. (2018) é um fenômeno que se desenvolve durante o armazenamento sob condições descontroladas de temperatura e umidade relativa.

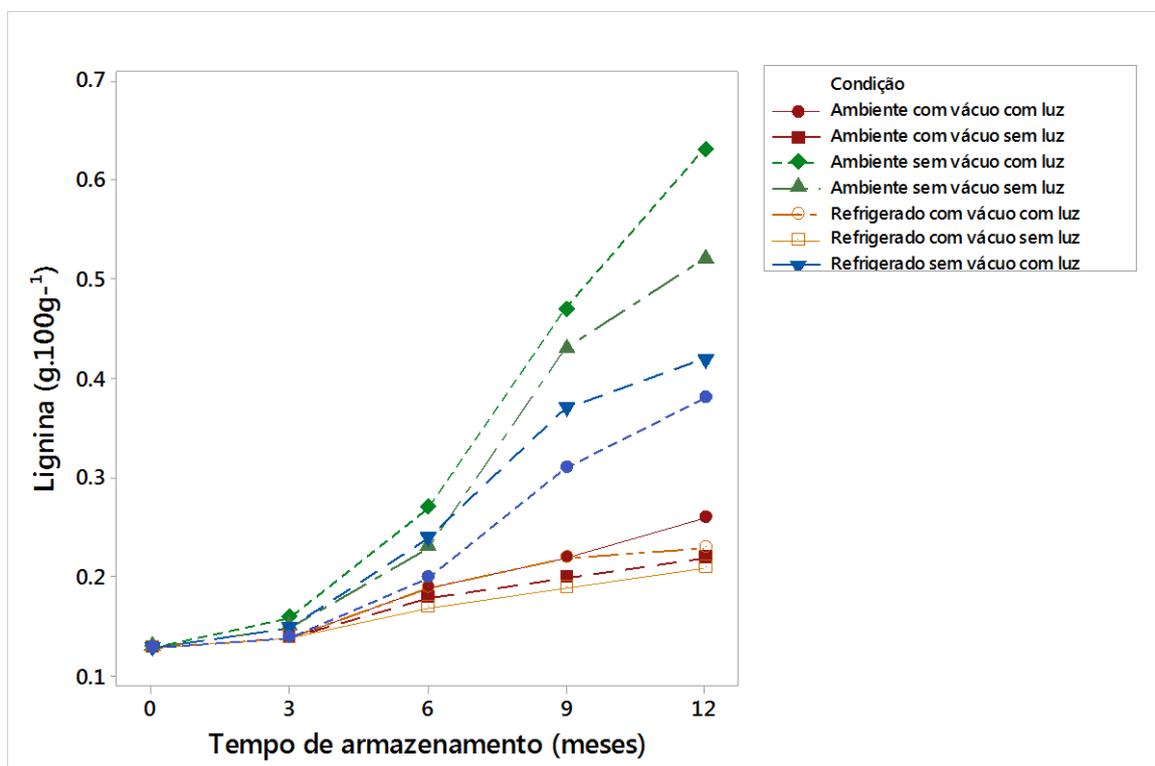


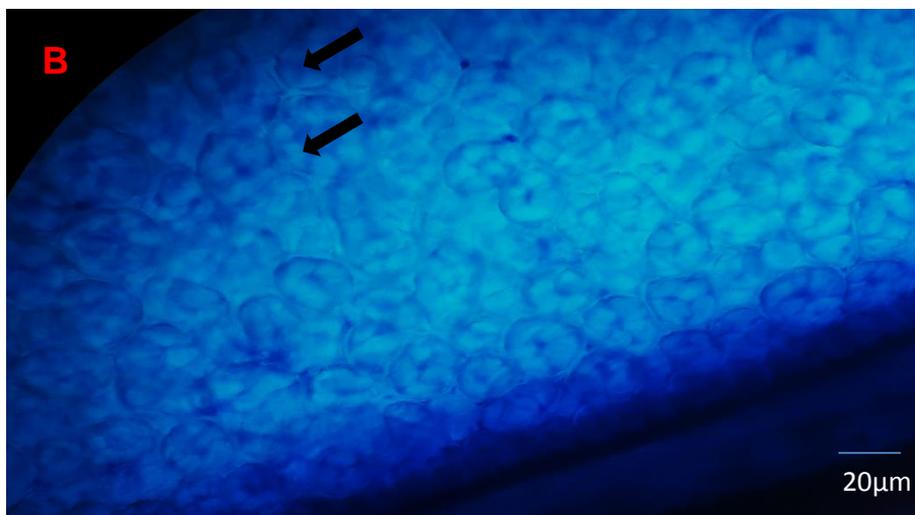
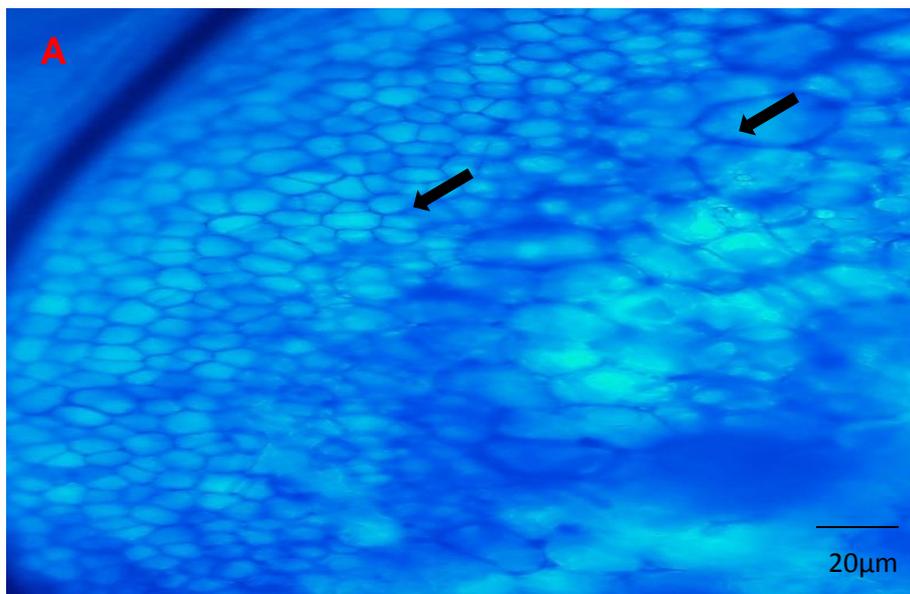
Figura 27. Lignina ($\text{g.}100\text{g}^{-1}$) em grãos de feijão armazenados por 12 meses em diferentes condições.

Tabela 21. Valor F para luz, temperatura, vácuo e tempo com a significância correspondente para avaliação da lignina

Condição	Valor F	Pr > F*
Luz	87,3	0,0007
Temperatura	183,3	0,0002
Vácuo	1498,5	<,0001
Tempo	1143,9	<,0001

*significativo a $p < 0,05$.

Na Figura 28 estão apresentadas as imagens de microscopia óptica do cotilédone dos grãos de feijão branco. A imagem (A) é de um grão em seu tempo inicial de armazenamento, a imagem (B) grãos refrigerados em embalagem à vácuo e (C) feijões mantidos em temperatura ambiente sem vácuo por 12 meses.



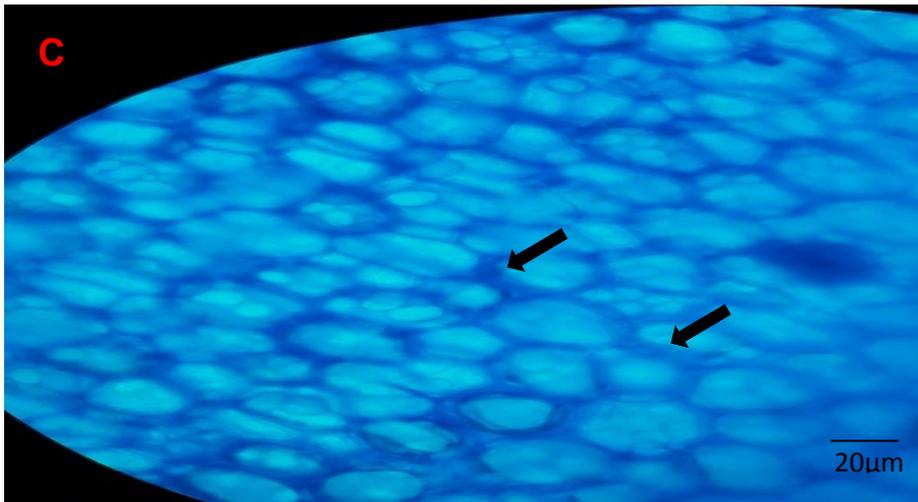


Figura 28. Imagem de microscopia ótica de grãos de feijão branco armazenados por 12 meses. (A) Tempo inicial de armazenamento (B) armazenamento a 8°C com vácuo (C) armazenamento a 25°C sem vácuo.

Conforme indicam as setas na Figura 27, no início do armazenamento não há evidências tão explícitas de deposição de lignina como nas demais amostras. A temperatura afetou inclusive as amostras refrigeradas, em que se percebe a lignificação da lamela média e com maiores depósitos nas amostras mantidas a temperatura ambiente durante 12 meses. Essa evidência confirma o endurecimento dos grãos indicado pelo maior tempo de cocção e menor coeficiente de hidratação das amostras.

A lignificação começa na lamela média composta, que compreende a lamela média e a parede celular primária e ocorre progressivamente em todas as camadas da parede celular e de células vizinhas. Algumas proteínas são capazes de orientar a deposição de lignina (proteínas dirigentes) como as proteínas oxidases (peroxidases e fenilalanina amônia liase). As mesmas podem desempenhar papéis diferenciados, atuando desde a resistência local, ou seja, no sítio de infecção, reforçando as barreiras físicas da planta por meio da lignificação, tanto na resistência em locais distantes do sítio de infecção (EUDES et al., 2014).

Além da atividade na ativação de barreiras físicas, estas enzimas também podem atuar de forma direta sobre os patógenos, por meio da participação na síntese de compostos fenólicos. O modelo proposto de lignificação com a participação de proteínas dirigentes é recente e, sugere que neste processo a formação de pontes individuais entre os radicais de monolignóis, produzindo dímeros, ocorra sob uma rígida regulação de proteínas específicas (HATFIELD & VERMERRIS, 2001).

Durante a síntese de lignina, muitos catalisadores inorgânicos, e até mesmo a luz, podem iniciar a polimerização de monolignóis, e as enzimas peroxidases e/ou suas isoformas atuam na parede celular para desencadear este processo (ZHAO et al., 2013). O processo de endurecimento do grão de feijão tem sido relacionado a diferentes mecanismos, mas principalmente à atuação enzimática. Possivelmente, durante o envelhecimento, o calor e umidade elevada causariam a ativação de determinadas enzimas presentes nos cotilédones, desencadeando inúmeras reações como a lignificação (VOXEUR, WANG & SIBOUT, 2015).

4.6. Análise Sensorial

A metodologia mais comumente usada para a caracterização sensorial dos alimentos é Análise Descritiva (DA), a qual é baseada na Análise Descritiva Quantitativa e no método do Espectro. O método DA é adequado para perfis sensoriais porque fornece resultados detalhados, consistentes e confiáveis (LAWLESS & HEYMANN, 2010).

A análise sensorial foi realizada no feijão branco no tempo inicial de armazenamento (F0), nos feijões mantidos a temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz (F12ASV) e nos feijões refrigerados com vácuo sem a presença de luz (F12RV). A escolha desses tratamentos foi devido as maiores variações encontradas nas análises físico-químicas.

O Perfil Descritivo das amostras foi realizado com os seguintes atributos: cor branca do grão cozido, cor branca do grão cru, maciez, ruptura do tegumento, granulidade, casca residual, sabor adocicado, sabor amargo, textura firme, ancorados na escala não estruturada pelos termos “ausente” e “presente”, impressão global, ancorada com os termos “ruim” e “ótima” e viscosidade do caldo ancorada com os termos “pouca” e “muita”.

Para avaliar a relação do tempo de armazenamento com as características sensoriais das amostras foi aplicada a Análise dos Componentes Principais, a qual o gráfico é demonstrado na figura 29. É possível verificar que a análise foi capaz de explicar 100% da variação dos dados experimentais, sendo F1 responsável por 95,47% e F2 por 4,53%.

Através da análise do gráfico, reforça-se a associação dos maiores valores de maciez, ruptura, sabor adocicado e casca residual para os feijões recém

armazenados, estando estes parâmetros e a amostra posicionados no quadrante inferior esquerdo. Esta amostra possui diferença significativa nesses atributos em relação a amostra armazenada em temperatura ambiente por 12 meses, localizada na extremidade oposta do componente principal 1. O feijão refrigerado por 12 meses, localizado no componente principal 2 foi caracterizado por apresentar coloração branca nos grãos crus e cozidos. Evidencia-se, portanto, que mesmo após 12 meses, a amostra manteve suas características em relação à cor. A viscosidade do caldo também foi mantida e os avaliadores tiveram uma ótima impressão global dos feijões armazenados a 8°C à vácuo por um ano.

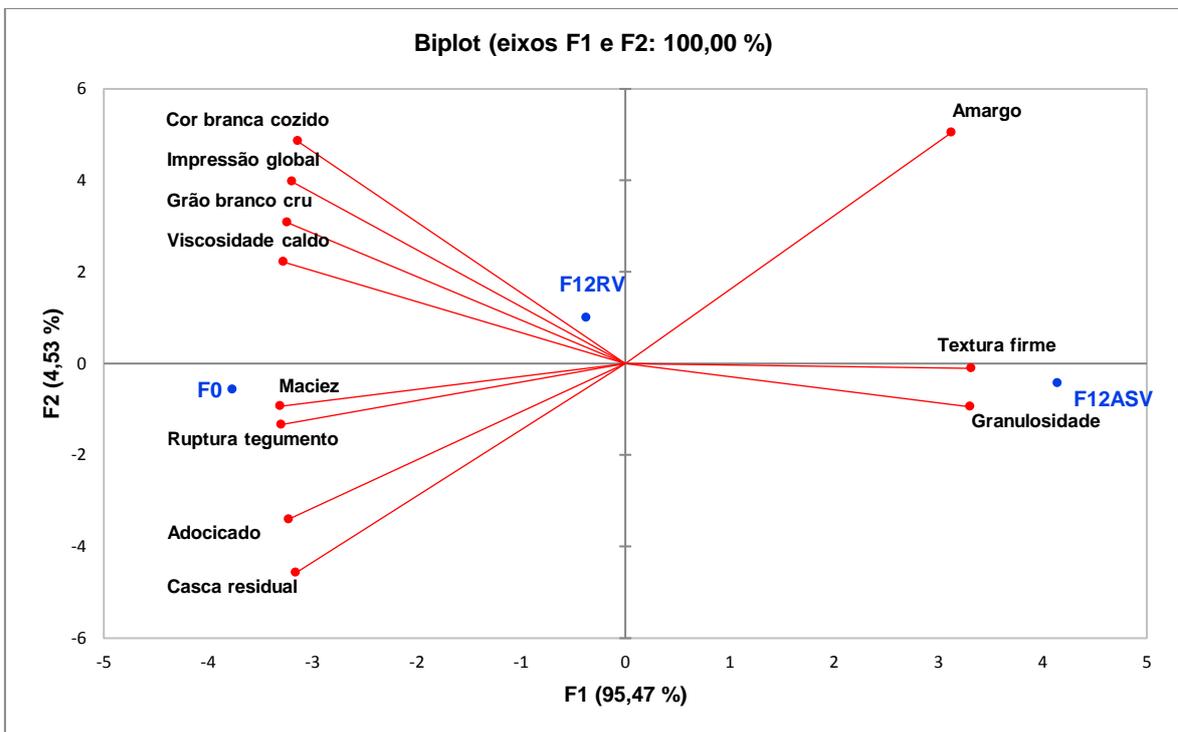


Figura 29. Análise de componentes principais sobre a matriz de correlação dos atributos avaliados nos feijões armazenados por 12 meses em diferentes condições.

F0 (tempo inicial de armazenamento); F12ASV (temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz); F12RV (refrigerados com vácuo sem a presença de luz).

Tabela 22. Matrix de correlação de Pearson para os atributos sensoriais dos grãos de feijão

Variáveis	CBC	MZ	RT	GN	CR	VC	AD	AM	GBC	TF	IG
CBC	1	0,926	0,916	-0,966	0,808	0,984	0,852	-0,788	0,993	-0,950	0,998
MZ	0,926	1	1,000	-0,992	0,970	0,978	0,987	-0,962	0,965	-0,998	0,947
RT	0,916	1,000	1	-0,989	0,976	0,973	0,991	-0,969	0,958	-0,996	0,939
GN	-0,966	-0,992	-0,989	1	-0,933	-0,996	-0,959	0,921	-0,990	0,998	-0,980
CR	0,808	0,970	0,976	-0,933	1	0,900	0,997	-0,999	0,873	-0,952	0,842
VC	0,984	0,978	0,973	-0,996	0,900	1	0,932	-0,885	0,998	-0,990	0,993
AD	0,852	0,987	0,991	-0,959	0,997	0,932	1	-0,994	0,909	-0,973	0,882
AM	-0,788	-0,962	-0,969	0,921	-0,999	-0,885	-0,994	1	-0,857	0,941	-0,824
GBC	0,993	0,965	0,958	-0,990	0,873	0,998	0,909	-0,857	1	-0,981	0,998
TF	-0,950	-0,998	-0,996	0,998	-0,952	-0,990	-0,973	0,941	-0,981	1	-0,967
IG	0,998	0,947	0,939	-0,980	0,842	0,993	0,882	-0,824	0,998	-0,967	1

CBC (cor branca grão cozido); MZ (maciez); RT (ruptura do tegumento); GN (granulosidade); CR (casca residual); VC (viscosidade do caldo); AD (sabor adocicado); AM (sabor amargo); GBC (cor branca do grão cru); TF (textura firme); IG (impressão global). Significância a $p < 0,01$.

Conforme a Tabela 22 indica, a cor dos grãos é fortemente correlacionada positivamente com a maciez, com a ruptura de tegumento e viscosidade do caldo. Isso se deve ao fato de que grãos de feijão quando recém-colhidos são macios após o cozimento, desmanchando-se facilmente e contribuindo para uma maior concentração de sólidos totais no caldo. Essas características favorecem uma impressão global maior do consumidor que prefere grãos com coloração clara, pois remete a grãos novos. A cor é talvez o atributo sensorial mais importante de um alimento, porque se for considerado inaceitável, a comida não será comprada e/ou consumida e, conseqüentemente, todos os outros os atributos sensoriais perdem a significância.

O atributo 'textura firme' apresentou correlação negativa com a cor dos grãos (-0,95), maciez (-0,99), impressão global (-0,96) e sabor adocicado (-0,97) e correlação positiva com a granulosidade (+0,93), demonstrando que grãos firmes após o cozimento são normalmente grãos afetados por condições inadequadas de armazenamento e conseqüentemente perdem sua maciez, denotando alterações na cor e no sabor.

Relações semelhantes foram encontradas em estudos de Rockenbach et al. (2018), em que avaliando feijões pretos foram encontradas correlações positivas entre os atributos cor e viscosidade do caldo e negativa com o atributo dureza.

A textura é uma avaliação de qualidade amplamente utilizada para determinar o consumo de grãos. A dureza ou firmeza dos grãos após a cocção é uma característica que compõe a textura do grão e é de grande importância na aceitação e atitude de compra pelo consumidor (WANI et al., 2017).

Através de modelos de análise de variância foi possível realizar uma caracterização mais detalhada das amostras, levando em consideração os efeitos isolados e interativos entre julgadores, amostras e sessões de avaliação. A tabela e os gráficos (Figuras 30, 31 e 32) a seguir mostram a média ajustada para cada combinação de descritor que representa a amostra. Cores azuis correspondem a um efeito positivo significativo e vermelho a um efeito negativo significativo.

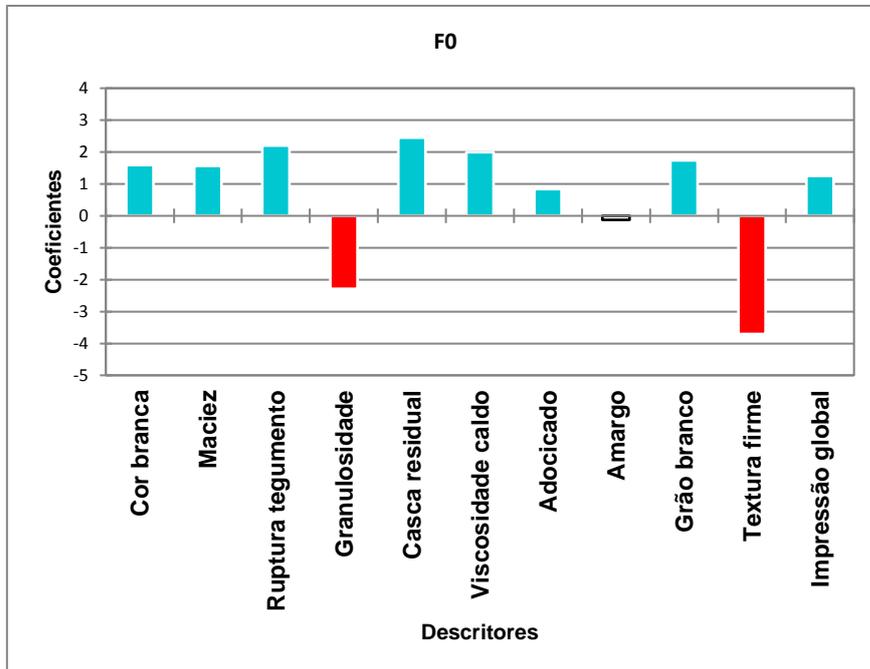


Figura 30. Descritores de caracterização dos feijões com tempo inicial de armazenamento.

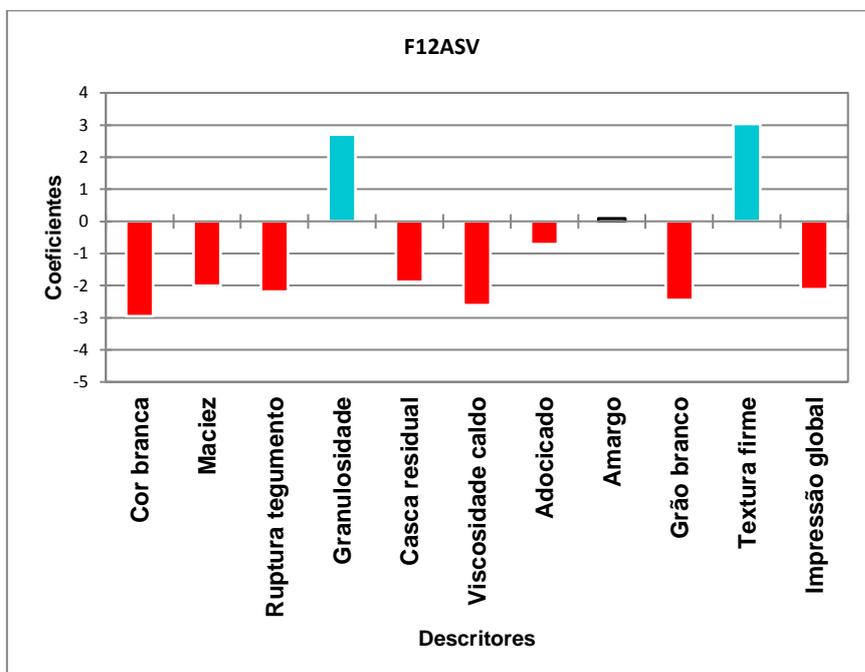


Figura 31. Descritores de caracterização dos feijões armazenados por 12 meses em temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz.

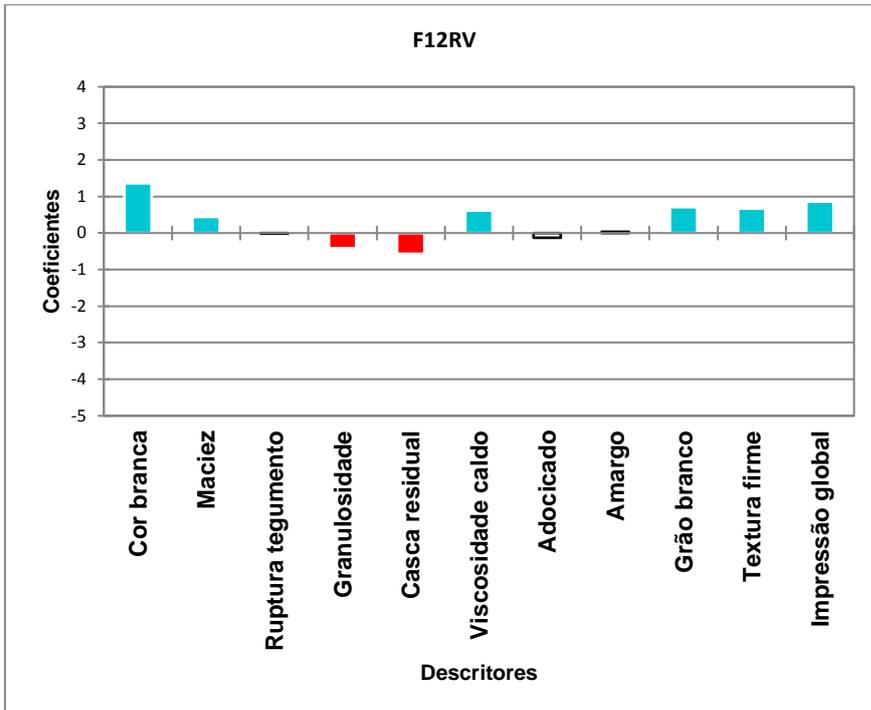


Figura 32. Descritores de caracterização dos feijões armazenados por 12 meses em temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz.

Tabela 23. Médias ajustadas dos atributos que caracterizam as amostras de feijão branco

	GN	TF	AM	CB	IG	CR	AD	GB	VC	MZ	RT
F12ASV	7,497	8,464	1,585	3,870	5,036	3,243	6,466	4,376	3,720	5,214	3,595
F12RV	4,382	6,102	1,527	8,184	8,012	4,558	7,047	7,533	6,944	7,662	5,767
F0	2,506	1,726	1,366	8,413	8,402	7,577	8,014	8,561	8,325	8,786	7,986

F0 (F0 (tempo inicial de armazenamento); F12ASV (temperatura ambiente sem vácuo com presença de luz); F12RV (refrigerados com vácuo sem a presença de luz).

GN (granulosidade); TF (textura firme); AM (sabor amargo); CB (cor branca grão cozido); IG (impressão global); CR (casca residual); AD (sabor adocicado); GB (cor branca do grão cru); VC (viscosidade do caldo); MZ (maciez); RT (ruptura do tegumento); significância a $p < 0,05$.

Conforme demonstrados nas Figuras 30, 31 e 32 e Tabela 23, a cor azul corresponde a médias significativamente maiores que a média global e a cor vermelha corresponde a médias significativamente menores que a média global. Os feijões no início do armazenamento e os feijões refrigerados tiveram igualmente as maiores médias para o atributo “cor branca dos grãos cozidos”, assim como para os grãos crus, além de apresentarem maciez, presença de viscosidade no caldo e ótima impressão global.

Os feijões armazenados em temperatura ambiente foram melhor caracterizados através dos atributos granulidade e textura firme, além de possuírem as menores médias para os demais atributos, o que comprova que esses feijões não mantiveram suas qualidades sensoriais após um ano.

4.7. Análise Proteômica

O método de extração, utilizando fenol tamponado foi eficiente na extração de proteínas, com uma concentração média final de 850 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína total. Nos géis bidimensionais foi observado um grande número de pontos individualizados de proteínas (*spots*), sem arrastes horizontais ou verticais, o que revela a ausência ou a baixa quantidade de interferentes como lipídeos e carboidratos. A reprodutibilidade experimental foi alcançada através da triplicata e *matches* das mesmas.

O gel correspondente ao feijão no tempo inicial de armazenamento (Figura 33) foi o que mais apresentou *spots* de proteína, 258 *spots* em média, seguido do gel referente ao feijão armazenado por 12 meses à 8°C com vácuo e ausência de luz (Figura 34), com 199 *spots*, em média. O gel de feijão armazenado por um ano sem vácuo à temperatura ambiente com presença de luz (Figura 35) foi o que apresentou o menor número de pontos proteicos, com média de 120 *spots*.

O menor número de pontos proteicos nos feijões armazenados por 12 meses, provavelmente, se deve as variações de temperatura e umidade em que foram submetidos esses feijões, que pode ter sido suficiente para provocar uma degradação/desnaturação de algumas proteínas ou para facilitar a atividade das proteases, causando, claramente, uma diferença nos perfis proteômicos observados.

A manutenção da qualidade do produto durante o armazenamento é influenciada pela constituição genética, por fatores ambientais e pela interação dos genótipos com o ambiente (SIQUEIRA et al., 2013). Por isso, as condições de armazenamento são essenciais para preservar a qualidade do feijão.

As condições de temperatura e de umidade relativa do ar durante o armazenamento podem alterar a qualidade dos grãos de feijão tanto no cozimento quanto na qualidade nutricional. Assim, grãos armazenados nessas condições tornam-se endurecidos e resistentes ao cozimento. Durante a estocagem do feijão ocorre uma deterioração gradual, irreversível e cumulativa, cuja velocidade depende

do ambiente, do produto em si e de sua condição no início do armazenamento (CHIGWEDERE et al., 2018).

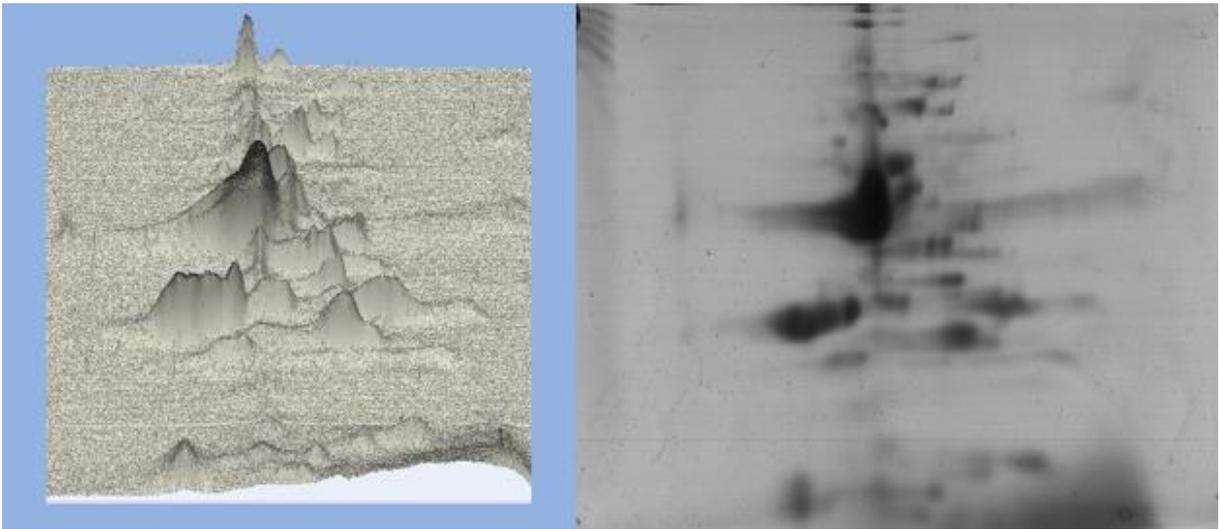


Figura 33. Gel bidimensional de feijão branco com tempo inicial de armazenamento.

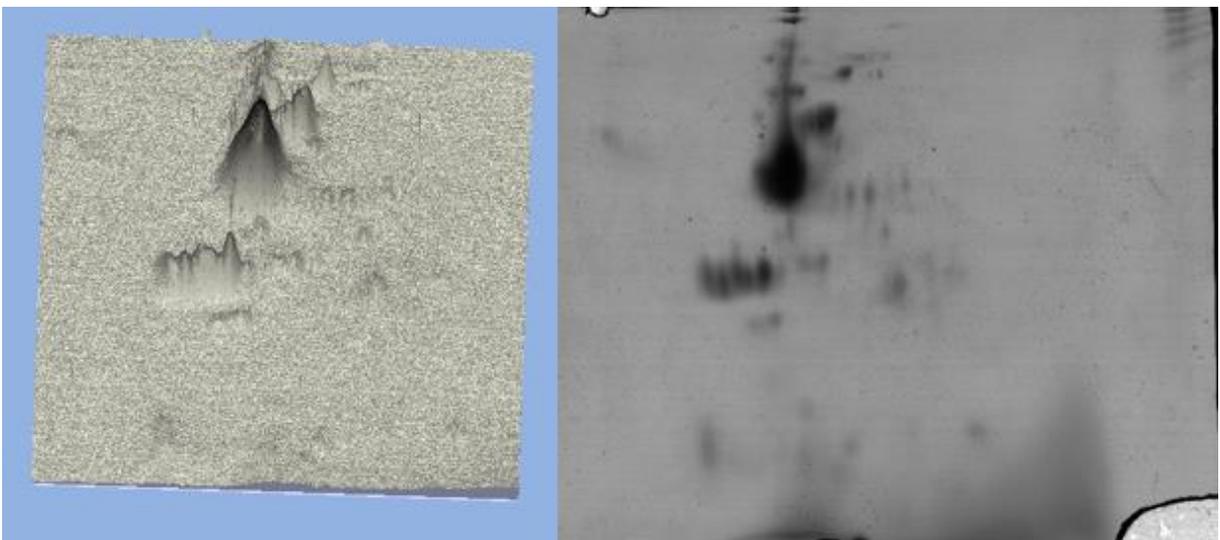


Figura 34. Gel bidimensional de feijão branco armazenado por 12 meses a 8°C com vácuo e sem presença de luz.

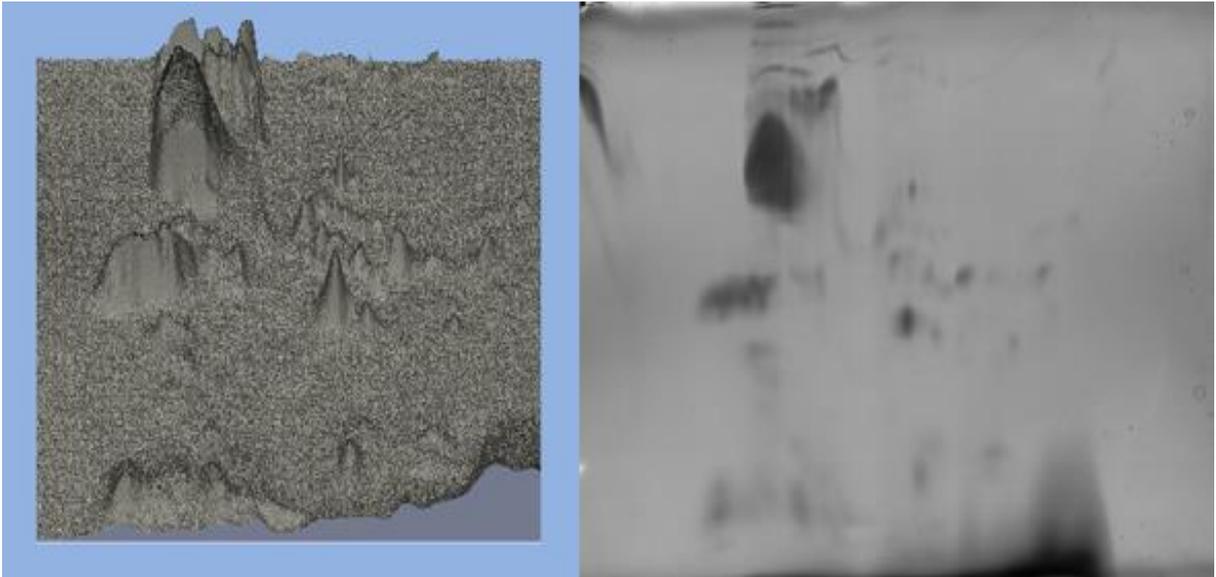


Figura 35. Gel bidimensional de feijão branco armazenado por 12 meses a temperatura ambiente sem vácuo e com presença de luz.

Ao se buscarem spots diferencialmente expressos entre os tratamentos, 28 spots foram destacados (Figura 36) como diferencialmente expressos (Tabela 5). Na análise proteômica dos feijões brancos, a maioria das proteínas foi focalizada entre pI 5-7, aproximadamente. E grande parte das proteínas que apresentaram expressão diferencial possuem massa molecular entre 14 e 64 kDa.

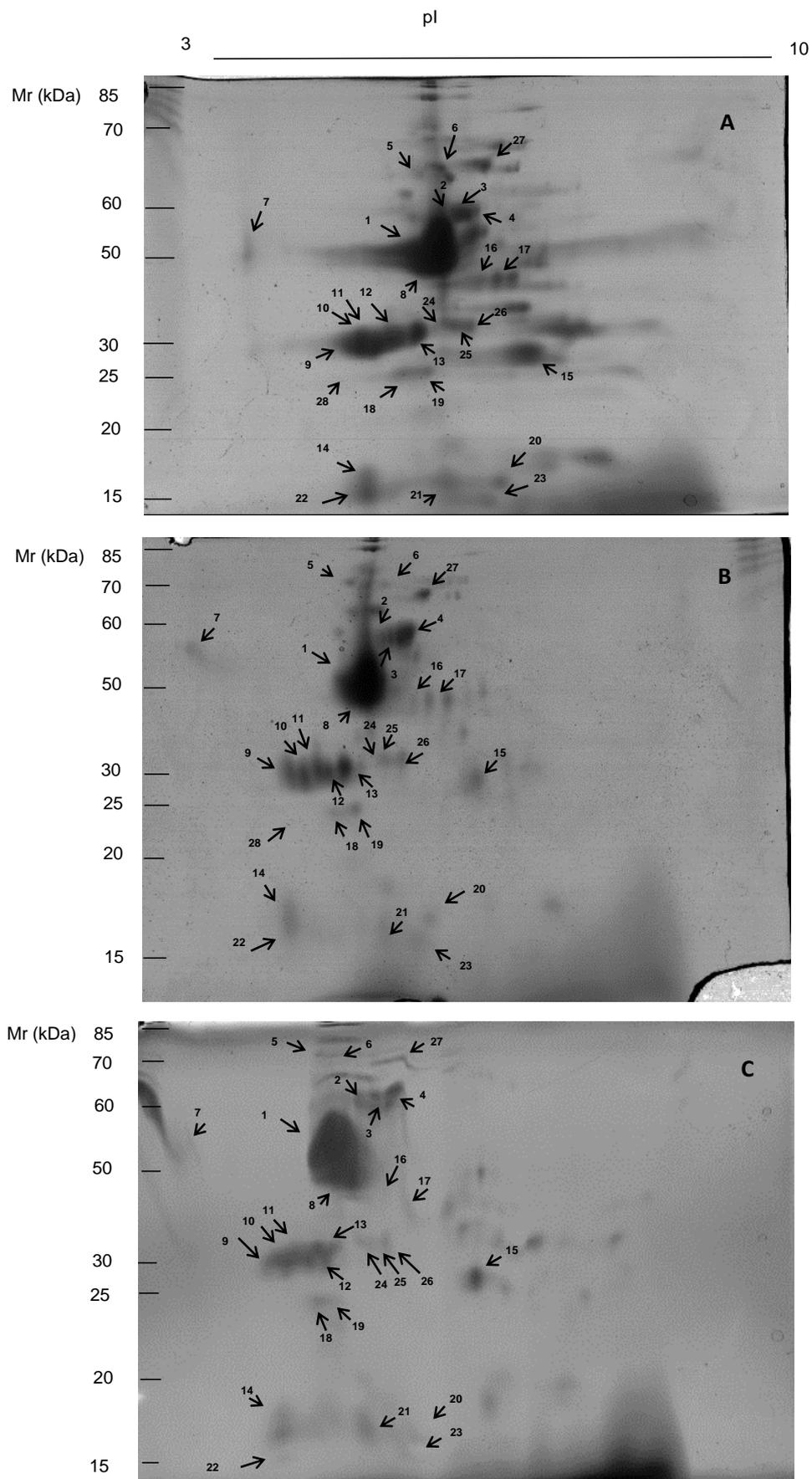


Figura 36. Mapa 2-DE de proteínas de feijão branco. Detalhes da identificação e propriedades das proteínas estão listadas na tabela 20.

A – feijão com tempo inicial de armazenamento; B – feijão refrigerado ($\pm 8^{\circ}\text{C}$) à vácuo com 12 meses de armazenamento; C – feijão em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) sem vácuo com 12 meses de armazenamento.

Tabela 24. Lista de proteínas diferencialmente expressas em feijão branco armazenados por 12 meses.

Spots	nº acesso (UniProtKB)	Proteína	Peso molecular experimental (kDa)	pl experimental	Peso molecular /pl teórico	Função
1	PHSA_PHAVU	Alpha-phaseolin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	52	6,38	46,69/5,13	proteína de reserva
2	Q2N1E0_PHAVU	Group 3 late embryogenesis abundant protein (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	55	6,7	36,5/6,38	embriogênese
3	F8QXP7_PHAVU	Legumin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	55	6,79	66,27/5,59	proteína de reserva
4	F8QXP7_PHAVU	Legumin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	56	6,89	66,27/5,59	proteína de reserva
5	G7JFK1_MEDTR	Heat shock 70 kDa protein (<i>Medicago truncatula</i>)	63	6,23	25,38/6,37	resposta a estresse
6	PHSA_PHAVU	Phaseolin, alpha-type (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	63	6,42	46,69/5,13	proteína de reserva
7	G7I9H2_MEDTR	Calreticulin (<i>Medicago truncatula</i>)	49	4,25	48,59/4,41	ligação com cálcio
8	PHSA_PHAVU	Alpha-phaseolin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	45	6,22	46,69/5,13	proteína de reserva
9	Q8RVH3_PHAVU	Phytohemagglutinin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	30	5,35	27,58/4,84	ligação com carboidratos
10	Q8RVH3_PHAVU	Phytohemagglutinin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	30	5,53	27,58/4,84	ligação com carboidratos
11	Q8RVH3_PHAVU	Phytohemagglutinin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	30	5,55	27,58/4,85	ligação com carboidratos
12	Q43628_PHAVU	Phytohemagglutinin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	31	5,94	27,26/5,19	ligação com carboidratos
13	Q43628_PHAVU	Phytohemagglutinin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	32	6,17	27,26/5,20	ligação com carboidratos
14	Q9S9E1_PHAVU	Alpha-amylase inhibitor beta subunit (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	15	5,61	13,55/4,86	inibição alfa-amilase
15	Q9MBC9_VIGUN	Yieldin (<i>Vigna unguiculata</i>)	29	7,49	36,87/5,87	metabolismo de carboidratos
16	Q43632_PHAVU	Phaseolin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	42	6,92	47,52/5,42	reserva de nutrientes
17	F8QXP7_PHAVU	Legumin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	43	7,12	66,21/5,64	proteína de reserva
18	Q43632_PHAVU	Phaseolin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	26	6,02	47,52/5,42	reserva de nutrientes
19	Q43632_PHAVU	Phaseolin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	25	6,19	47,52/5,43	reserva de nutrientes
20	HSP21_SOLPE	17.3 kDa class II heat shock protein (<i>Solanum peruvianum</i>)	16	7,15	17,31/6,32	resposta a estresse
21	Q9M7M4_PHAVU	Mannose lectin FRIL (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	15	6,56	27,92/5,50	ligação com carboidratos
22	Q9S9E1_PHAVU	Alpha-amylase inhibitor beta subunit (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	14	5,59	13,55/4,86	inibição alfa-amilase
23	Q9M7M4_PHAVU	Mannose lectin FRIL (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	14	5,01	27,92/5,50	ligação com carboidratos
24	PDIA6_MEDSA	Probable protein disulfide-isomerase A6 (<i>Medicago sativa</i>)	34	6,52	37,32/5,29	catalisa ligações dissulfídicas
25	F8QXP7_PHAVU	Legumin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	33	6,63	66,27/5,59	proteína de reserva
26	F8QXP7_PHAVU	Legumin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	33	6,81	66,27/5,60	proteína de reserva
27	F8QXP7_PHAVU	Legumin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	64	6,99	66,27/5,61	proteína de reserva
28	Q9SMH0_PHAVU	Alpha-amylase inhibitor like protein (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	25	5,34	26,34/4,76	inibição alfa-amilase

Grãos de feijão comum contêm aproximadamente 15 - 25% de proteína com base no seu peso seco. Sathe (2002) relatou que grande parte das proteínas do feijão são composta de globulinas, que são solúveis em soluções salinas e representam até 54-79% e albuminas solúveis em água que respondem por até 10- 30% das proteínas totais. As albuminas relatadas são tipicamente compostas de várias proteínas diferentes, incluindo lectinas e enzimas inibidoras.

As globulinas são as principais proteínas de reserva das fabáceas. Osborne e Campbell (1898) separaram a globulina da ervilha (*Pisum sativum*), em 2 frações principais chamadas vicilina e legumina, de acordo com sua solubilidade em diferentes concentrações de sal e por diferentes propriedades de coagulação no calor. As leguminas são proteínas que apresentam uma molécula maior e mais resistente ao calor, além de apresentarem maiores concentrações de aminoácidos sulfurados que as vicilinas. Derbyshire et al. (1976) relataram que a legumina representa uma importante proteína de armazenamento em soja, favas e sementes de ervilha.

A legumina foi encontrada em 6 dos 28 *spots* analisados (#3, 4,17,25,26 e 27) com pesos moleculares entre 33 a 64 kDa e ponto isoelétrico entre 6,63 e 7,12. Rossi et al. (2017) comparando 4 cultivares de feijão comum relatou a ocorrência de dois *spots* identificados como legumina com pesos moleculares de 38 e 81 kDa. A heterogeneidade molecular da legumina é bem documentada e é devido à flexibilidade da região dessa proteína do tipo 11S suscetíveis a proteólise (BALSAMO et al., 2015).

A faseolina compreende de 50 a 60% da proteína total da semente de feijão quando madura e até 75% da globulina total. A faseolina é uma glicoproteína, contendo maltose, glucosamina e açúcares neutros, podendo ter de 3 a 6 % de açúcares. As faseolinas são uma família de proteínas cuja composição polipeptídica apresenta heterogeneidade de carga e/ou tamanho molecular. Essa diversidade molecular da faseolina tem sido usada como indicador da evolução do feijoeiro domesticado na América Central e nos Andes (LOPEZ-PEDROUS et al., 2014).

Verificou-se vários *spots* identificados como faseolina nos géis 2D-PAGE das proteínas do feijão branco (Figura 35). Os resultados mostraram que dos 28 pontos identificados, 6 *spots* são de faseolina (#1,6,8,16,18 e 19) com pesos moleculares entre 25 e 63 kDa. Recentemente De La Fuente et al. (2011) usaram a análise 2D-PAGE e compararam proteínas de feijão comum extraídas por diferentes métodos, eles identificaram 15 *spots* de faseolina de peso molecular e pontos isoelétricos

diversos, igualmente como o presente estudo. As diferenças em MW e pI encontradas refletem sequências de genes diferentes codificando para duas sub-famílias polipeptídicas diferentes, como alfa-faseolina e beta-faseolina, derivadas do mesmo ancestral como sugerido por De La Fuente et al. (2012).

Muitas sementes contêm proteínas de defesa, incluindo lectinas e inibidores de amilase (α -AI), que foram as primeiras proteínas identificadas no feijoeiro *P. vulgaris*. São distribuídas tanto na fração de albuminas quanto na de globulinas e são relativamente termoláveis. Lectinas são glicoproteínas que se ligam a carboidratos, e também são referidas como fito-hemaglutininas (PHA) devido a propriedade de aglutinarem células, principalmente os eritrócitos, o que confere a elas uma natureza tóxica e antinutricional, contribuindo para a baixa digestibilidade da faseolina (CHAMP, 2002).

No entanto, há também funções benéficas atribuídas a essas proteínas, podendo-se citar: transporte e armazenamento de açúcares, controle do crescimento da planta, proteção da semente contra herbívoros e fungos, mediadores de simbiose entre os micro-organismos fixadores de nitrogênio, proteína de reserva (PRATT et al., 1993). Além desses, há estudos revelando benefícios das lectinas na saúde, incluindo antitumoral, antifúngico, antiviral, anticancerígeno e evitando rejeição no transplante de medula óssea (SHI, ARNTFIELD & NICKERSON, 2018).

Na análise proteômica dos feijões armazenados foram encontrados 5 *spots* de proteínas fito-hemaglutininas (#9,10,11,12 e 13) e 2 *spots* de lectinas que se ligam a manoses (#21 e 23). O peso molecular e o pI das lectinas variaram de 15 - 30 kDa e 5,01 a 6 respectivamente. Rossi (2017) reportou a identificação dessas proteínas em 3 *spots*.

Recentemente, a pesquisa tem concentrado interesses nas proteínas do feijão que possuem funções específicas, são os chamados “bloqueadores de amido”. A proteína inibidora da α -amilase (α AI), conhecida como faseolamina, é isolada do feijão comum, e tem sido relatada por possuir um grande potencial para tratar obesidade e diabetes sem efeitos colaterais. Várias empresas farmacêuticas têm comercializado extratos de feijão para controlar o apetite (YAO et al., 2015).

Ao sequenciar os aminoácidos dessa proteína, a partir da farinha de *P. vulgaris* cultivar Rico, Mirkov et al. (1994) detectaram a presença de 2 proteínas diferentes, com as subunidades α e β . No presente estudo, detectou-se 3 *spots* identificados

como inibidores de alfa-amilase (#14,22 e 28) com pesos moleculares entre 15 e 25 kDa e pl de 5, resultados semelhantes aos encontrados por De La Fuente et al. (2011).

Condições ambientais adversas como seca, variações de temperatura ou salinidade provocam uma série de alterações bioquímicas e moleculares nas plantas. Como resposta a esses estresses, as plantas produzem um grupo de proteínas que supostamente desempenham papéis protetores.

Um grupo dessas proteínas pertence a família das desidrinas. As desidrinas integram o conjunto de genes *COR* e suas proteínas são sintetizadas durante situações de desidratação celular, o que ocorre durante estágios de desenvolvimento ou em resposta a estímulos ambientais, tais como baixas temperaturas, perda de água ou alta salinidade. Essas proteínas se acumulam durante os últimos estágios da embriogênese das sementes e são conhecidas como LEA (proteínas abundantes na embriogênese tardia). Além disso, essas proteínas ajudam a manter a estrutura de proteínas e membranas. Algumas proteínas podem proteger as atividades enzimáticas, ou interagir com açúcares para evitar a agregação de proteínas. (KURBIDAEVA; NOVOKRESHCHENOVA, 2011).

Outras proteínas relacionadas ao estresse, são sintetizadas em resposta a temperaturas elevadas e durante vários processos de desenvolvimento, incluindo maturação de sementes, elas são conhecidas como HSPs (proteínas do choque térmico). Wang et al (2004) descreveu que a síntese de HSP é um desenvolvimento regulado, sendo abundante em sementes maduras secas e que desaparece durante a germinação.

Através da análise proteômica dos feijões armazenados foi possível identificar um *spot* (#2) das proteínas 'LEA'. Foram encontrados 2 *spots* (#5 e 20) relacionados as proteínas HSP. Zdražnik et al. (2013) ao estudar o efeito do estresse hídrico em feijões identificou a proteína do choque térmico da classe I de 17,7 kDa.

As demais proteínas identificadas na proteômica do feijão branco estudado são envolvidas no metabolismo geral do feijão, síntese de nucleotídeos e compostos secundários as quais são os *spots* (#7, 15 e 24). Natarajan et al. (2013) descreveram a extração, separação e identificação de 141 *spots* na análise proteômica de feijão comum.

Alguns *spots* exibiram discrepâncias entre os valores teóricos e experimentais no peso molecular e/ou pl. Além disso, diferentes *spots* foram identificados como a mesma proteína. Essas discrepâncias podem corresponder a isoformas geradas por

várias causas, incluindo modificações pós-traducionais, splicing alternativo (processo regulado durante a expressão gênica que resulta na codificação de múltiplas proteínas por um mesmo gene) e a ocorrência de famílias multigênicas (conjunto de genes originados por duplicação e variação de algum gene ancestral).

Com o intuito de caracterizar e comparar os níveis de acúmulo relativo das proteínas fez-se uma avaliação utilizando o software Image Master Platinum com base no volume dos spots (Tabela 25).

Tabela 25. Média da abundância (% volume) das proteínas responsivas ao armazenamento por 12 meses em feijão branco

Abundância proteica (% Vol)			
Amostras			
Spots	Inicial	12 Refrigerado	12 Ambiente
1	51,65 ^a	37,62 ^b	25,92 ^c
2	1,98 ^a	1,45 ^c	1,93 ^b
3	2,70 ^a	1,71 ^b	0,86 ^c
4	2,80 ^a	2,50 ^b	0,41 ^c
5	0,13 ^c	0,20 ^b	0,53 ^a
6	0,58 ^a	0,44 ^b	0,24 ^c
7	0,14 ^c	0,39 ^a	0,18 ^b
8	4,10 ^a	3,12 ^b	0,83 ^c
9	1,98 ^c	2,99 ^a	2,43 ^b
10	3,95 ^c	4,32 ^b	4,76 ^a
11	3,80 ^a	3,64 ^b	2,81 ^c
12	3,74 ^b	2,49 ^c	4,66 ^a
13	3,04 ^b	4,49 ^a	1,12 ^c
14	2,41 ^a	1,50 ^b	1,19 ^c
15	4,40 ^b	2,45 ^c	4,56 ^a
16	1,46 ^a	0,22 ^b	0,22 ^b
17	1,18 ^a	0,92 ^b	0,39 ^c
18	0,55 ^a	0,45 ^b	0,13 ^c
19	0,36 ^a	0,30 ^b	0,26 ^c
20	0,13 ^c	0,35 ^b	1,57 ^a
21	0,23 ^b	0,03 ^c	0,70 ^a
22	0,23 ^a	0,06 ^b	0,04 ^c
23	0,42 ^b	0,14 ^c	0,50 ^a
24	0,61 ^a	0,33 ^b	0,20 ^c
25	0,75 ^a	0,45 ^b	0,38 ^c
26	1,03 ^a	0,84 ^b	0,43 ^c
27	1,12 ^a	0,80 ^b	0,41 ^c
28	0,04 ^a	0,03 ^b	0,00 ^c

Média da porcentagem de volume das proteínas (n=3), letras diferentes na linha diferem significativamente a $p \leq 0,05$ (teste Tukey). Inicial (tempo inicial de armazenamento), 12 Refrigerado (feijão refrigerado à vácuo com 12 meses de armazenamento), 12 Ambiente (feijão em temperatura ambiente sem vácuo com 12 meses de armazenamento).

Após o alinhamento/sobreposição dos géis de todos os tratamentos realiza-se ‘*matches*’, ou seja, o programa Image Master Platinum realiza correspondências entre os *spots* de cada tratamento, que representam a mesma proteína nos géis. O software fez a correspondência de 103 *spots* das amostras com tempo inicial de armazenamento, desses 103 *spots* apenas 78 *spots* foram encontrados na amostra refrigerada por 12 meses e 63 *spots* na amostra mantida em temperatura ambiente.

A partir da análise dos *matches* verificou-se a abundância proteica (% Vol – média do volume ocupado por cada *spot* no gel) das 28 proteínas expressas e as diferenças quantitativas das amostras armazenadas por 12 meses comparando com a amostra no tempo inicial. Dessa análise, se verificou que 13 das proteínas identificadas foram diferencialmente acumuladas no tempo inicial de armazenamento.

Proteínas de reserva como a faseolina e leguminas apresentaram seus maiores volumes na amostra inicial seguidas das amostras refrigeradas por 12 meses e baixos níveis foram detectados nas amostras mantidas em temperatura ambiente, indicando comprometimento na estrutura desses feijões (Figuras 37 e 38). O tempo prolongado de armazenamento é a causa de muitas mudanças fisiológicas no interior dos grãos e, conseqüentemente, da provável degradação/utilização de compostos, entre eles as proteínas e aminoácidos (CHIDANANDA et al., 2014).

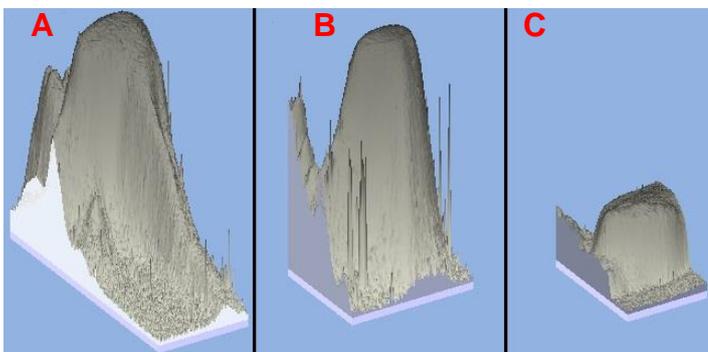


Figura 37. Imagem 3D dos *spots* da alpha-phaseolin comparando os armazenamentos. A- Feijão com tempo inicial de armazenamento; B – feijão refrigerado por 12 meses; C – feijão em temperatura ambiente por 12 meses.

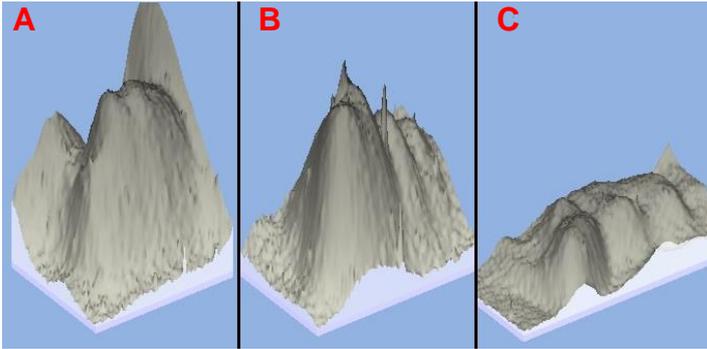


Figura 38. Imagem 3D dos spots de legumin comparando os armazenamentos.

A- Feijão com tempo inicial de armazenamento; B – feijão refrigerado por 12 meses; C – feijão em temperatura ambiente por 12 meses.

Com relação a proteína de grande interesse nesse estudo, a faseolamina (*spots* #14, 22 e 28) pode-se observar que a mesma foi degradada ao longo do armazenamento, mesmo nas amostras refrigeradas à vácuo, demonstrando que essa proteína é afetada pelas variações de temperatura e tempo (Figura 39). Com isso, podemos inferir que para uma melhor extração e purificação dessa proteína para fins medicinais é aconselhável utilizar feijões recém-colhidos para uma melhor eficiência e quantidade.

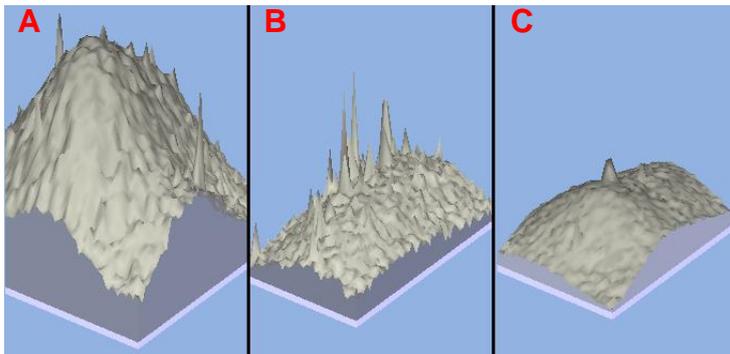


Figura 39. Imagem 3D dos spots de alpha-amylase inibidor comparando os armazenamentos.

A- Feijão com tempo inicial de armazenamento; B – feijão refrigerado por 12 meses; C – feijão em temperatura ambiente por 12 meses.

Nos três tratamentos as proteínas do choque térmico foram identificadas (*spots* #5 e 20) com acúmulos significativamente ($p < 0,05$) crescentes ao longo do armazenamento, comprovando o estresse sofrido antes e durante o armazenamento.

Essas proteínas ativam um mecanismo de defesa complexo e altamente conservado, como também desempenham papel fundamental tanto durante a síntese,

montagem, dobramento e degradação de proteínas. As mudanças no ambiente intra ou extracelular podem ser desencadeadas por uma variedade de sinais, incluindo danos ao DNA, resposta aos estresses, térmico, osmótico, e oxidativo, dentre outras injúrias. Os níveis dessas proteínas são aumentados, auxiliando, desta forma, a síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas afetadas pelo estresse metabólico (KOSOVÁ et al., 2011).

Variações nas proteínas fitohemaglutininas e nas associadas ao metabolismo também foram observadas (#spots 10, 12, 15, 21 e 23) principalmente nos feijões armazenados por um ano a 25°C sem vácuo, indicando modificações sofridas nessas amostras.

A alta higroscopicidade dos grãos e as variações de temperatura acarretam desenvolvimento de fungos logo após 5 a 10 semanas de armazenamento, além de serem afetados por contaminação microbiana. As alterações nas vias metabólicas, com ativação de rotas degradativas e de síntese são as principais consequências que afetam os grãos com armazenamento inadequado (RANI et al., 2013).

Fica evidente, portanto, que o efeito da temperatura combinada com o tempo de armazenamento provoca desnaturação/degradação de proteínas, reações ainda desconhecidas que têm estas macromoléculas como substrato. Bem como afeta as estruturas internas dos grãos, ocasionando a liberação de compostos que induzem a atividade enzimática de proteases.

5. CONCLUSÕES

O feijão comum classe branco orgânico foi afetado pelas condições e pelo tempo de armazenamento de doze meses, influenciando no aumento da umidade e no tempo de cocção dos grãos e diminuindo o teor de proteína e o coeficiente de hidratação;

A utilização de embalagem de polietileno protegida da luz com atmosfera à vácuo combinado com o armazenamento a 8°C foi eficiente em retardar o escurecimento e o endurecimento dos grãos;

As amostras de feijão branco armazenadas por 12 meses sofreram perdas significativas da faseolamina, principalmente aquelas armazenadas sem vácuo;

A digestibilidade proteica, o teor de ácido fítico e a inibição da tripsina tiveram um decréscimo em seus valores após um ano, enquanto que, os oligossacarídeos e a lignina apresentaram maiores conteúdos, sobretudo nas amostras armazenadas em temperatura ambiente;

A análise sensorial revelou que atributos cor, textura e maciez são os atributos mais percebidos e desejados no feijão;

As condições e o tempo de armazenamento interferiram no perfil proteômico dos feijões brancos, reduzindo substancialmente a quantidade de pontos proteicos mais abundantes nos feijões armazenados por um ano.

5. REFERÊNCIAS

- ABBOT, A. News briefing: a post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, v. 402, n. 6367, p. 715-720, 1999.
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v.152, p. 46–55, 2014.
- AÇAR, Ö. Ç.; GÖKMEN, V.; PELLEGRINI, NICOLETTA; F. V. Direct evaluation of the total antioxidant capacity of raw and roasted pulses, nuts and seeds. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 6, p. 961–969, 2009.
- AKILLIOGLU, H.G.; KARAKAYA, S. Effects of heat treatment and *in vitro* digestion on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. **European Food Research and Technology**, v. 229, p.915–921, 2009.
- AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of broad bean seed extract and its phenolic composition. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 656-662, 2017.
- AMORIM, L. L. **Formas reduzidas de inibidor Bowman - Birk, biodisponibilidade em íleo isolado de camundongo e atividade no proteossoma**. 2009, 78p. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) –Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.
- ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification. **Phytochemistry**, v.61, p.221-294, 2012.
- ANWAR, F.; CHATHA, S.A.S.; HUSSAIN, A.I. Assessment of oxidative deterioration of soybean oil at ambient and sunlight storage. **Grasas y Aceites** v. 58, p. 390-395, 2007.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of Analysis**. 18 ed. Washington DC US, 2006.
- ARA, N.; NAKKANONG, K.; LV, W.; YANG, J.; HU, Z.; ZHANG, M. Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species (“*Cucurbita maxima*” and “*Cucurbita moschata*”) and their interspecific inbred line “Maxchata”. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, p. 24008-24028, 2013.
- ARAUJO, W.M.C. **Alquimia dos alimentos**. 3 ed. Brasília: Ed Senac, 2014.
- ASHOURI, S.; POURABAD, F.; FARSHBAF, R.; KOCADAG, E.; ZIHNIOGLU, F. Influence of red kidney bean seed proteins on development, digestive α -amylase activity and gut protein pattern of *Leptinotarsa decemlineata*. **Journal of the Entomological Research Society**, v.19, n.3, p.69-83, 2017.
- AVILA, B. P., BRAGANCA, G. C., PEREIRA, A., GULARTE, M. A., ELIAS, M. C. Effect of Preparation and Freezing Methods on the Concentration of Resistant Starch,

Antinutritional Factors and FODMAPs in Beans. **Current Nutrition & Food Science** v.13, 2017.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2013.

BALSAMO, G. M.; VALENTIM-NETO, P. A.; MELLO, C. S.; ARISI, A. C. M. Comparative proteomic analysis of two varieties of genetically modified (GM) Embrapa 5.1 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their non-GM counterparts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 10569–10577, 2015.

BARAPAMA, Z.; SIMARD, R. E. Oligosaccharide, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. **Journal of Food Science** v. 59, p. 833-838, 1994.

BASSINELLO, P. Z. KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. **Qualidade nutricional, funcional e tecnológica do feijão**. In: Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 2009. p.385-424.

BAILLY, C. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Plantarum**, v. 97, n. 1, p. 104-110, 2013.

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**, v. 51, p. 7879–7883, 2003.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Reviews: Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.

BOWMAN, D. E. Amylase inhibitor in navy beans. **Science**, Washington. v. 102, p. 2649, 1945.

BRACKMANN, A.; NEUWALD, D. A.; RIBEIRO, N. D.; FREITAS, S. T. Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca em armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 911-915, 2002.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Feijão. **Instrução Normativa nº12** de 28 de março de 2008.

BROETTO, F.; LÜTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Influence of light intensity and salt-treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidativo response system of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Functional Plant Biology**, v. 29, p.13-23, 2002.

BROOKER, D.B.; BAKKER-ARKEMA, F.W.; HALL, C.W. **Drying and Storage of Grains and Oil seeds**. New York,1992. 450p.

CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, v. 1, n. 5, p. 1-15, 2003.

CAMPOS-VEGA, R.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAH, B. D. Minor components of pulses and their potential impact on human health. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 461–482, 2010.

CAMPOS-VEGA, R.; REYNOSO-CAMACHO, R.; PEDRAZA-ABOYTES, G.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; GUZMAN-MALDONADO, S. H.; PAREDES-LOPEZ, O.; OOMAH, B. D.; LOARCA-PIÑA, G. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 74, p.59-65, 2009.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 742-749, 2000.

CARNEIRO, J. C. S; MINIM, V. P. R.; SOUZA, M.M; CARNEIRO, J. E. S.; ARAÚJO, G. A. A. Perfil sensorial e aceitabilidade de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, 2005.

CHAMP, M. M. J. Non-nutrient bioactive substance of pulses. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 3, p. 307-319, 2002.

CHEN, X.; REN, L.; LI, M.; QIAN, J.; FAN, J.; Du, B. Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh cut lettuce. **Food Chemistry**, v. 214, p. 432 – 439, 2017.

CHIDANANDA, K. P.; CHELLADURAI, V.; JAYAS, D. S.; ALAGUSUNDARAMB, K.; WHITE, N. D. G.; FIELDS, P. G. Respiration of pulses stored under different storage conditions. **Journal of Stored Products Research**, v. 59, p. 42–47, 2014.

CHIGWEDERE, C. M.; OLAOYE, T. F.; KYOMUGASHO, C.; KERMANI, Z. J.; PALLARES, A. P.; LOEY, A. M. V.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. E. Mechanistic insight into softening of Canadian wonder common beans (*Phaseolus vulgaris*) during cooking. **Food Research International**, v.106, p. 522-531, 2018.

CHOKSHI, D. Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Kearny, v.45, n.3, p.32–40, 2007.

COELHO, C. M. M.; BELLATO, C. M.; SANTOS, J. C. P.; ORTEGA, E. M. M.; TSAI, S. M. Effect of phytate and storage conditions on the development of the 'hard-to-cook' phenomenon in common beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p.1237–1243, 2007.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2016/2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 09 dezembro, 2017.

COSCUETA, E. R.; PINTADO, M. E.; PICÓ, G. A.; KNOBE, G.; BOSCHETTI, C. E.; MALPIEDI, L. P.; NERLI, B.B. Continuous method to determine the trypsin inhibitor activity in soybean flour. **Food Chemistry**, v. 214, p.156-161, 2017.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991-1000, 2007.

CROFT, M.; BICKSLER, A.; MANSON, J.; BURNETTE, R. Vacuum Sealing vs. Refrigeration: Which is the most effective way to store seeds? **Echo Asia Notes** v.14, 2016.

CUMMINGS, J. H. Review. A new look at dietary carbohydrate: physiology and health. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 417-423, 1997.

DAROLT, M. R. **Agricultura orgânica: inventando o futuro**. Londrina: IAPAR, 2002. 250 p.

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

DE LA FUENTE, M.; BORRAJO, J.; BERMÚDEZ, M. LORES, J.; ALONSO, M. L. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds, **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 262–267, 2011.

DELFINO, R. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Polyphenol and protein interaction and the effect on protein digestibility in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Perola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n.2, p. 3-8, 2010.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLES, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyper oxygenic and hyper osmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, p. 3-24, 1976.

DEY, P. M. Oligosaccharides. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1990. pp. 189–218.

DÍAZ, A. M.; CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 2, p. 595-601, 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, p. 2045-2052, 2006.

DIDONET, A. D.; MOREIRA, J. A. A.; FERREIRA, E. P. B. COMUNICADO TECNICO 173 EMBRAPA. **Sistema de Produção Orgânico de Feijão para Agricultores Familiares**, 2009, 8p.

DOMENE, S. M. A. **Técnica Dietética: Teoria e Aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 128p.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Editora Champagnat, 1996. 123 p.

DYBALLA, N. & METZGER, S. Fast and sensitive colloidal Coomassie g250 staining for proteins in polyacrylmide gels. **Journal of visualized experiments**, v. 30, 2009.

ELIAS, M.C.; ZIEGLER, V; ROMANO, C; OLIVEIRA, M. Propriedades físico-químicas e enzimática de grãos de feijão secos em diferentes temperaturas e armazenados por 225 dias. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 1295-1306, 2016.

ELIAS, L. G.; BRESSANI, R. Effect of salt solutions on the cooking time, nutritional and sensory characteristics of common beans. **Food Technology**, v. 22, p. 336-338, 1992.

EL-HADY, E. A.; HABIBA, R.A. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie** v. 36, p. 285–293, 2013.

EL-REFAI, A. A.; HARRAS, H. M.; EL-NEMR, K. M.; NOAMAN, M. A. Chemical and technological studies on faba bean seeds. I. Effect of storage on some physical and chemical properties. **Food Chemistry**, v. 29, p. 27-39, 1988.

EUDES, A.; LIANG, Y.; MITRA, P.; LOQUE, D. Lignin bioengineering. **Current Opinion in Biotechnology** v. 26, p.189-198, 2014.

FAO/OECD. **Perspectivas Agrícolas, 2016-2025**, OECD Publishing, Paris. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en\(2016\)](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en(2016)). Acesso em: 10/08/2017.

FAUROBERT, M.; PELPOIR, E., CHAÏB, J. **Methods in Molecular Biology**, vol. 335: Plant Proteomics: Methods and Protocols Edited by: H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, and V. Méchin, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007, 390p.

FERHMAN, H.; DIAMOND, A. E. Peroxidase activity and phytophthora resistance in different organs of the potato plant. **Phytopathology**, v.57, p. 69 - 72, 1967.

FERREIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; BATISTA, L. A. R. Effect of drying method and length of storage on tannin and total phenol concentrations in *Pigeon pea* seeds. **Food Chemistry**, Washington, v. 86, n. 1, p. 17-23, 2004.

FRAGA, C. G. **Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology**. New Jersey: Wiley & Sons, 2009. 593p.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v.29, n.2, p. 397–412, 2002.

FREITAS, F.O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n.7, p.43-56, 2006.

GOFF, D. H.; REPI, N.; FABEK, H.; KHOURY, D.E.; GIDLEY, M. J. Dietary fibre for glycaemia control: Towards a mechanistic understanding. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v.12, p. 6-12, 2017.

GULARTE, M. A. **Manual de Análise Sensorial de Alimentos**. Ed. graf UFPel: Pelotas, 2009. p.109.

GULARTE, M. A.; ÁVILA, B.P.; DIERINGS, E. J.; PEREIRA, A. M. **Manual Prático de Análise Sensorial: arroz e feijão**. Editora Santa Cruz, Pelotas, 2017. 92p.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. **Defensivos Agrícolas Naturais**, Embrapa, DF, 1ªed., 2016, 853p.

HATFIELD, R.; VERMERRIS, W. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. **Plant Physiology**, v. 126, n.4, p.1351-1357, 2001.

HAN, E. Anti-obesity effects of chikusetsu saponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p.25-35, 2013.

HAUG, W.; LANTZSCH, H. J. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, p.1423-1426, 1983.

HOU, H. J.; CHANG, K. C. Yield and textural properties of tofu as affected by the changes of phytate content during soybean storage. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 64, n.4, p. 1185-1191, 2003.

HSU, H. W. Multi enzyme technique for estimating protein digestibility. **Journal of Food Science and Technology**, v.42, n.5, p.1269-1273, 1977.

IADEROZA, M. Atividade de polifenoloxidase e alterações da cor e dos teores de taninos condensados em novas cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante o armazenamento. **Coletânea do ITAL**, v. 19, n. 2, p. 154 - 164,1989.

IBGE. **Censo agropecuário 2015**: agricultura familiar - primeiros resultados. Rio de Janeiro, 2015. 267 p.

JAYAS, D. S.; KHANGURA, B.; WHITE, N. D. G. Controlled atmosphere storage of grains. **Postharvest News and Information**, v.2, n.6, p.422-427, 1991.

JEBARA, M.; MOHAMED, E. A.; PAYRE, H.; JEAN-JACQUES, D. Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes under phosphorus deficiency. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p. 309-315, 2005.

JOCELYN, H.; ILAG, L. Dividing and conquering proteomics. **Proteomics**, Weinheim, Germany, p. 96-98, 2002.

JOSÉ, S. C. B. R.; PINHO, É. V. R.; DIAS, M. A. G. S. Açúcares e tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p.60-68, 2006.

JOUBERT, R.; BRIGNON, P.; LEHMANN, C.; MONRIBOT, C.; GENDRE, F.; BOUCHERIE, H. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. **Yeast**, Chichester, England, v. 16, n. 6, p. 511-522, 2000.

JUNGBLUT, P. R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 10, p. 831-840, 2001.

JUNK-KNIEVEL, D. C.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. An accelerated post-harvest seed coat darkening protocol for pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown across different environments. **Crop Science**, v. 47, p. 692–700, 2007.

KAKADE, M.L., RACKIS, J.L., MCGHEE, J.E., PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy bean products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, 376-382, 1974.

KOBLITZ, M.G.B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 301p.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress - contribution of proteomic studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, p.1301-1322, 2011.

KUMAR, V.; SHARMA, M.; KHARE, T.; WANI, S. H. Impact of nanoparticles on oxidative stress and responsive antioxidative defense in plants. **Nanomaterials in plants, algae, and microorganisms concepts and controversies**: v.1, p. 393–406. 2018.

KURBIDAEVA, A. S.; NOVOKRESHCHENOVA, M. G. Genetic control of plant resistance to cold. **Russian Journal of Genetics**, v. 47, n. 6, p. 646-661, 2011.

LÁSZTITY, R.; LÁSZTITY, L. J. Phytic acid in Cereal Technology, In: **Advances in Cereal Science and Technology 10**, Pomeranz, Y., Ed., AACC Publ., St. Paul, MN. Chapter 5. 2010.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. Sensory evaluation of food principles and practices. 1ed. Missori: **Food Science**, Texte Series, 1998, 257p.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. Sensory evaluation of foods. Principles and practices. **Sensory evaluation of foods - Principles and practices** (2nd ed.). New York: 2010, 358p.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 31-67, 1994.

LIMA, R. A. Z.; TOMÉ, L. M.; ABREU, C. M. P. Embalagem a vácuo: efeito no escurecimento e endurecimento do feijão durante o armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.9, p.1664-1670, 2014.

LIN, P-Y; LAI, H. M. Bioactive compounds in legumes and their germinated products, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3807–3814, 2006.

LIMA JÚNIOR, A. F. Controle de pragas de grãos armazenados: uso e aplicação de fosfatos. **Revista Faculdade Montes Belos**, v.5, p.180-194, 2013.

LINSBERGER-MARTIN, G.; WEIGLHOFER, K.; PHUONG, T.; BERGHOFER, E. High hydrostatic pressure in fluences antinutritional factors and in vitro protein digestibility of split peas and whole white beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n.1, p. 331-336, 2013.

LISZKAY, A.; VAN DER ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3114-3123, 2004.

LIU, X.; HUANG, B. Heat stress injury in relation to membrane lipid per oxidation in creeping bent grass. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 503-510, 2000.

LOPEZ-PEDROUSO, M.; BERNAL, J.; FRANCO, D.; ZAPATA, C. Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p.7200–7208, 2014.

LUNA-VITAL, D. A.; DE MEJÍA, E. G.; MENDOZA, S.; LOARCA-PIÑA, G. Peptides present in the non-digestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inhibit the angiotensin-I converting enzyme by interacting with its catalytic cavity independent of their antioxidant capacity. **Food & Function**, v. 6, p. 1470-1479, 2015.

MACCIONI, P.; COLOMBO, G.; RIVA, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; GESSA, G. L.; CARAI, M. A. M. Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on operant self-administration of a chocolate flavored beverage in rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.104, n.5, p.624–628, 2010.

MACHADO, C. M.; FERRUZZI, M. G.; NIELSEN, S. S; Impact of the hard-to-cook phenomenon on phenolic antioxidants in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v. 56, n. 9, p. 3102-3110, 2008.

MADHUJITH T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of food science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 85-90, 2005.

MAKKAR, H.P.S.; BLUEMEL, M.; BOROWY, N.K.; BECKER, K., Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, p. 161–165, 1993.

MAMBRIN, R. P.; RIBEIRO, N. D.; HENNING, L. M.; HENNING, F. A.; BARKERT, K. A. Seleção de linhagens de feijão com base no padrão e na qualidade de sementes. **Revista Caatinga**, v. 28, n.3, p. 147- 156, 2015.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; LAZZARI, S. M. N.; PINTO JÚNIOR, A. R. Inhibitors of digestive enzymes of insect pests. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v.4, n.1, p. 57-61, 2006.

MARSHALL, J. J.; LAUDA, C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α amylase, from the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v.250, n.20, p. 8030-8037, 1975.

MARTÍNEZ-MANRIQUE, E.; JACINTO-HERNÁNDEZ, C.; GARZA-GARCÍA, R.; CAMPOS, A.; MORENO, E.; BERNAL-LUGO, I. Enzymatic changes in pectic polysaccharides related to the beneficial effect of soaking on bean cooking time. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, p. 2394-2398, 2011.

MIRKOV, T. E.; CHRISPEELS, M. J. Mutation of Asn (128) to Asp of *Phaseolus-vulgaris* - Leuko agglutinin (Pha-L) eliminates carbohydrate binding and biological-activity. **Glycobiology**, v. 3, p.581–587, 1994.

MODESTO, Z. M. M.; SIQUEIRA, N. J. B. **Botânica**. São Paulo: EPU, 1981.

MOHAN, R. J.; SANGEETHA, A.; NARASIMHA, H. V.; TIWARI, B. K. Post-harvest technology of pulses. In: **Pulse foods: processing, quality and technological applications**. Academic press, 2011,192p.

MOLINA-INFANTE, J.; SERRA, J.; FERNANDEZ-BAÑARES, F.; MEARIN, F. The low-FODMAP diet for irritable bowel syndrome: Lights and shadows. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 39, n. 2, p. 55–65, 2016.

MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SPOTO, M. H. F.; ARTHUR, V. Avaliação sensorial de feijão preto submetido à radiação de Cobalto-60. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 370-374, 2005.

MULLEN, R. T.; KING, J. E.; GIFFORD, D. J. Changes in mRNA populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification, germination and post germinative growth. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 3, p. 545-553, 1996.

NA, L.; MAO, W.; XUE, L.; SHUYAO, W.; ZHENG, X.; SUJIAN, C. Sequence analysis of the pyruvylated galactan sulfate-derived oligosaccharides by negative-ion electrospray tandem mass spectrometry. **Carbohydrate Research**, v. 433, p. 80- 88, 2016.

NASAR-ABBAS, S. M.; PLUMMER, J. A.; SIDDIQUE, K. H. M.; WHITE, P.; HARRIS, D.; DODS, K. Cooking quality of faba bean after storage at high temperature and the role of lignins and other phenolics in bean hardening. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, p.1260 – 1267, 2008.

NATARAJAN, S. S.; PASTOR-CORRALES, M. A., KHAN, F. H.; GARRETT, W. M. Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 9, p. 424-437, 2013.

NGOH, Y.Y.; GAN, C. Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and alpha-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**, v. 190, p. 331–337, 2016.

NJOROGE, D. M., KINYANJUI, P. K., MAKOKHA, A. O., CHRISTIAENS, S., SHPIGELMAN, A., SILA, D. N.; HENDRICKX, M. E. Extraction and characterization of pectic polysaccharides from easy- and hard-to-cook common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Research International**, v. 64, p. 314–322, 2014.

NTATSI, G.; GUTIÉRREZ-CORTINES, M. E.; KARAPANOS, I.; BARROS, A.; WEISS, J.; BALLIU, A.; ROSA, E. A. dos S.; SAVVAS, D. The quality of leguminous vegetables as influenced by preharvest factors. **Scientia Horticulturae**, v. 232, n.17, p. 191-205, 2018.

NUMAO, S.; MAURUS, R.; SIDHU, G.; WANG, Y.; OVERALL, C.M.; BRAYER, G.D.; WITHERS, S.G. Three-dimensional structure analysis of the r337a variant of human pancreatic alpha-amylase. **Biochemistry**, v. 41, p. 215-25, 2002.

OCTÁVIO, L. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylase. Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v.269, p. 397-412, 2002.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal Biology Chemistry**, USA, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, V.; R.; RIBEIRO, N. D.; JOST, E.; COLPO, E.; POERSCH, N. L.; Perfil sensorial de cultivares de feijão sob diferentes tempos de cozimento. **Brazilian Journal Food Nutrition**, v.24, n.2, p.145-152, 2013.

OLIVEIRA, A. C.; CARRARO, F.; REIS, S. M. P. M. The elimination of the not absorbed water during common bean soaking resulted in weight gain in rats. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.14, p.153-155, 2011.

OOMAH, B. D.; CORBÉ, A.; BALASUBRAMANIAN, P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris L.*) hulls. **Journal of Agriculture of Food Chemistry**, v.58, p.8225-8230, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. (v. 1). 294p.

OSBORNE, T.B.; CAMPBELL, G.F. Proteids of the pea. **Journal of the American Chemical Society**, v. 20, p. 348-362, 1898.

OTLES, S.; SAHYAR, B.Y. Intelligent Food Packaging. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 74, p. 377-387, 2016.

OZCAN, T.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; YILMAZ-ERSAN, L.; DELIKANLI, B. Phenolics in Human Health. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 5, 2014.

PAREDES-LÓPEZ, O.; MAZA-CALVIÑO, E. C.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, J. Effect of the hardening phenomenon on some physico - chemical properties of common bean. **Food Chemistry**, v. 31, p. 225–236, 1989.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 534-540, 2004.

PEIXOTO, H. P. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, A. M. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-43, 1999.

PEREIRA, C. C. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos e sensoriais de grãos de café armazenados em temperatura ambiente e em ar resfriado**. 154 p. Dissertação – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J. C.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 20, n. 18, p.3551-3567, 1999.

PERUSSELLO, A. C.; MARIANI, V.C.; AMARANTE, A.C. Combined modeling of thermal properties and freezing process by convection applied to green beans. **Applied Thermal Engineering**, v. 31, n. 14-15, p. 2894-2901, 2011.

PETTERSON, D. S.; MAKINTOSH, J. B. The Chemical composition and nutritive value of Australian grain legumes, **Grains Research and Development Corporation**, Brisbane, Australia, p. 10–13, 38-41, 1994.

PRATT, R. C.; SINGH, N. K.; SHADE, R. E.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A. Isolation and partial characterization of a seed lectin from Tepary bean that delays bruchid beetle development. **Plant Physiology**, v. 93, n.4, p. 1453-1459, 1993.

PUSZTAI, A. Inhibition of starch digestion by α -amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1554-1562, 1995.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 1917p.

QIAN, M. Molecular basis of the effects of chloride ion on the acid-base catalyst in the mechanism of pancreatic α -Amylase. **Biochemistry**, v.44. n.9, p. 3194-3201, 2013.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; GAYTÁN-MARTÍNEZ, M.; SÁNCHEZ, E. M.; LOARCA-PIÑA, G. Functional properties and sensory value of snack bars added with common bean flour as a source of bioactive compounds. **LWT**, v. 89, p. 674-680, 2018.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A.; REYNOSO-CAMACHO, K.; MENDOZA-DÍAZ, R.; LOARCA-PIÑA, S. G. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. **Food Chemistry**, v. 161, p. 254-260, 2014.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

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**, v. 57, p. 5734–5742, 2010.

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

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REDDY, N. R.; PIERSON, M. D.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Interactions of phytate with proteins and minerals. In N. R. Reddy, M. D. Pierson, S. K. Sathe, & D.

K. Salunkhe (Eds.), **Phytates in cereals and legumes** (pp. 57–70). Boca Raton, FL: CRC Press. 1989.

REDONDO, D.; VENTURINI, M. E.; ORIA, R.; ARIAS, E. Inhibitory effect of microwaved thinned nectarine extracts on polyphenol oxidase activity. **Food Chemistry**, v. 197, p. 603–610, 2016.

RIBEIRO, N. D.; POERSCH, N. L.; ROSA, S. S. Períodos de semeadura e condições de armazenamento na qualidade de cozimento de grãos de feijão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 936-941, 2008.

RICHARDSON, M.; BLOCH, C. Jr. A new family of small (5 kDa) protein inhibitor of insect amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat alpha-purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, n. 1, p. 101-104, 2001.

RIOS, A. O.; ABREU, S. M. P.; CÔRREA, A. D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, p. 39-45, 2003.

ROCKENBACH, R.; ÁVILA, B.; BRAGANÇA, G.; MONKS, J.; PERES, W.; GULARTE, M.; ELIAS M. Effect of different hydration temperatures on the sensory, nutritional, and instrumental profile of black beans. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 2, 2018.

RODRIGUES, J. A.; RIBEIRO, N. D.; LONDERO, P. M. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; GARCIA, D. C. Correlação entre absorção de água e tempo de cozimento de cultivares de feijão. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 209-215, 2015.

ROSSI, G. B.; VALENTIM-NETO, P. A.; BLANK, M.; FARIA, J. C.; ARISI, A. C. M. Comparison of grain proteome profiles of four Brazilian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 7588–7597, 2017.

SANDSTEDT, R. M.; KNEEN, E.; BLISH, M. J. **Cereal Chemistry**, v. 16, 1943, 712p.

SATHE, S. K. Dry bean protein functionality. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p.175-23, 2002.

SCHUETZ, M.; BENSKE, A.; SMITH, R. A.; WATANABE, Y.; TOBIMATSU, Y.; RALPH, J.; DEMURA, T.; ELLIS, B.; SAMUELS, A. L. Lacases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. **Plant Physiology**, v. 166, p. 798-807, 2015.

SEBASTIÁ, V.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M.J. Effects of legume processing on calcium, iron and zinc contents and dialysabilities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 1180-1185, 2002.

SHI, L.; ARNTFIELD, S. D.; NICKERSON, M. Changes in levels of phytic acid, lectins and oxalates during soaking and cooking of Canadian pulses. **Food Research International**, v.107, p. 660-668, 2018.

SILVA, H. C.; BRAGA, G. L. Effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of dry beans (*P. vulgaris*). **Journal of Food Science**, v. 47, p. 924-925, 1992.

SILVA, C. A. B.; BATES, R. P.; DENG, J. C. Influence of soaking and cooking upon the softening and eating quality of black beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1716-1720, 1981.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; KAUR, A.; SINGH, N. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, v. 101, p.1-16, 2017.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p. 19-30, 2015.

SIQUEIRA, B.; VIANELLO, R. P.; FERNANDES, K. F.; BASSINELLO, P. Z. Hardness of carioca beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by cooking methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n.1, p.13–17, 2013.

TORMO, M. A.; GIL-EXOJO, I.; DE TEJADA, A. R.; CAMPILLO, J. E. White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 539–544, 2006.

UDANI, J.; SINGH, B.B. Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using a proprietary fractionated white bean extract. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v.13, p. 32-37, 2007.

VALDÉS, S. T.; COELHO, C. M. M.; MICHELLUTI, D. J.; TRAMONTE, V. L. C. G. Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **LWT – Food Science and Technology**, v.44, p.2104-2111, 2011.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds: IV. Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of AOAC International**, v.50, p.50, 1967.

VARRIANO-MARSTON, E.; JACKSON, G. M. Hard-to-cook phenomenon in beans: structural changes during storage inhibition. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, p. 1379-1385, 2001.

VINDIOLA, O. L.; SEIB, P. A.; HOSENEY, R. C. Accelerate development of the hard-to-cook state in beans. **Cereal Foods Word**, v. 31, p. 538, 1986.

VOXEUR, A.; WANG, Y.; SIBOUT, R. Lignification: different mechanisms for a versatile polymer. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 23, p. 83–90, 2015.

WANG, H. H.; CHEN, C. L.; JENG, T. L.; SUNG, J. M. Comparisons of α -amylase inhibitors from seeds of common bean mutants extracted through three phase partitioning. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1066–1071, 2011.

WANG, N.; HATCHER, D. W.; TOEWS, R.; TYLER, R. T.; GAWALKO, E. J. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, v. 43, n. 589-594, 2010.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 244-52, 2004.

WANI, I. A.; SOGI, D.S.; WANI, A.A.; GILL, B.S. Physical and cooking characteristics of some Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.16, n. 1, p. 7-15, 2017.

WARHAM, E. Comparison of packaging materials for seed with particular reference to humid tropical environments. **Seed Science & Technology**, Zürich, v. 14, n. 1, p. 191-211, 2002.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part II: course manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER, R; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in practice**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 318 p.

WILKINS, M. R. J. C.; SANCHEZ, A. A.; GOOLEY, R. D.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Sydney, Australia, v. 13, p.19–50, 1996.

XU, Q.; CHAO, Y. L.; WAN, Q. B. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 435-441, 2009.

YAO, Y.; HU, Y.; ZHU, Y.; GAO, Y.; REN, G. Comparisons of phaseolin type and α -amylase inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in China. **The Crop Journal**, v. 4, n. 1, p. 68-72, 2016.

YOUSIF, A.M.; KATO, J.; DEETH, H.C. Effect of storage time and conditions on the seed coat color of Australian adzuki beans. **Food Australia**, v. 55, n.10, p. 479-484, 2013.

YOUSIF, A. M.; KATO, J.; DEETH, H. C. Effect of storage on the biochemical structure and processing quality of adzuki bean (*Vigna angularis*). **Food Reviews International**, v. 23, p. 1-33, 2007.

ZADRAŽNIK, T.; HOLLUNG, K.; EGGE-JACOBSEN, W.; MEGLIČ, V.; ŠUŠTAR-VOZLIČ, J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Proteomics**, v. 78, n.14, p. 254-272, 2013.

ZAUBERMAN, G. Postharvest retention of the red color of litchi fruit pericarp. **Scientia Horticulturae**, v.46, n.1-2, p.89-97, 1991.

ZHAO, C.; WU, Y.; LIU, X.; LIU, B.; CAO, H.; YU, H.; SARKER, S. D.; NAHAR, L.; XIAO, J. Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 135-145, 2017.

ZHAO, Q.; NAKASHIMA, J.; CHEN, F.; YIN, Y.; FU, C.; YUN, J.; SHAO, H.; WANG, X.; WANG, Z.; DIXON, R. A. Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 25, p. 3976-3987, 2013.