

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FEIJÕES: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS
ANNIE CAMPELLO TELLES

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de pós-
graduação em Engenharia e
Ciência de Alimentos da
Universidade Federal do Rio
Grande, como requisito para
obtenção do título de mestre.

Prof^a. Dr^a Eliana Badiale Furlong
Orientadora

Rio Grande, RS

2015

T274f Telles, Annie Campello.
Feijões: características químicas e ocorrência de aflatoxinas / Annie
Campello Telles. – 2015.
77 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio
Grande/RS, 2015.

Orientadora: Dr^a. Eliana Badiale-Furlong.

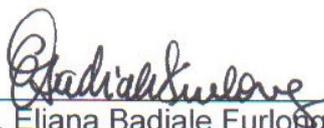
1. Feijão 2. Aflatoxinas 3. Proteínas 4. Compostos fenólicos 5. Amilase
fúngica I. Badiale-Furlong, Eliana II. Título.

CDU 664:582.739

Catálogo na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

APROVAÇÃO

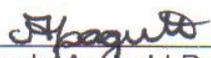
Dissertação defendida por Annie Campello Telles e aprovada em 27 de março de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



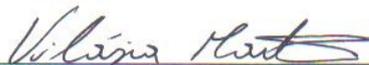
Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG



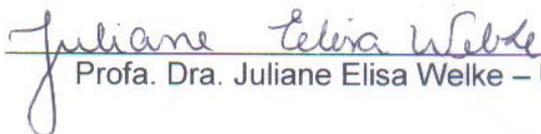
Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos – FURG



Profa. Dra. Fernanda Arnold Pagnussatt – FURG



Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG



Profa. Dra. Juliane Elisa Welke – UFRGS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Orion e Cleonice. Muito obrigada por todo amor e apoio incondicional. Obrigada por confiar e acreditar em mim sempre. Dedico à vocês não apenas este trabalho, mas tudo que sou hoje. Vou ser grata para sempre.

Aos meus irmãos, Orion e Angelo. Obrigada pela compreensão nos momentos em que estive ausente, obrigada pelo silêncio nas horas em que foi necessário e muito obrigada por aguentar o mau humor dos dias difíceis. Amo vocês pra sempre.

Ao meu amor, melhor amigo, companheiro de todas as horas, meu namorado Rodrigo. Quero agradecer por todo apoio que sempre me deste, inclusive com meus gráficos, tabelas e cálculos no excel. Obrigada por confiar, me amar do jeito que sou e estar comigo em todos os momentos.

À minha orientadora Eliana. Quero agradecer pela oportunidade, por confiar no meu trabalho, pela atenção diária (inclusive nos finais de semana), pela amizade. Sempre me apoiou e me ajudou a tomar todas decisões necessárias. Um exemplo de profissional dedicada e que ama muito o seu trabalho. A senhora é um exemplo para mim em todos os sentidos. Obrigada por tudo.

À minha amiga Náthali. Obrigada por estar comigo em todos os momentos. Obrigada pela ajuda de todos os dias. Todos os dias mesmo. Obrigada pelo carinho, atenção e confiança. Obrigada pelos momentos de alegria, risadas, pelo papo jogado fora, por matar a academia comigo e pelo ombro sempre que é necessário. Uma amizade que não é de hoje e que tenho a certeza que quero levar para a vida toda. Obrigada por existir Náthali.

À minha amiga Larine. Obrigada por me transmitir sabedoria e confiança. Uma pessoa sensível, apaixonada e muito dedicada ao seu trabalho, que não se cansa em ajudar o próximo. Muito do que eu aprendi durante este tempo agradeço a ti também. Obrigada pela amizade, paciência e por me auxiliar mesmo de longe. Por me apoiar em todos os momentos, em todas as decisões. Estou te esperando para tomar aquele nosso café no “Crozen” e comer bolo de cenoura. Te quero pra sempre comigo Lalá.

À minha amiga Priscila. Mais uma amiga que fiz durante o mestrado. Inteligente, companheira, honesta e acima de tudo sensível. Obrigada por me apoiar todos os dias com o teu jeitinho “descomplicado de ser”. Me mostrando que as coisas podem ser mais simples do que eu imagino. Obrigada pelas conversas e conselhos tanto no lado profissional como no lado pessoal. Obrigada por me incentivar em tudo, inclusive à ir para academia, à praticar corridas.. e obrigada por confiar em mim.

À minha amiga Anelise. Obrigada por tudo. Pela atenção, pelas conversas, pelo apoio. Obrigada por ter este coração enorme e sensível. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas (e foram muitas). Obrigada por ser esta pessoa alegre que sempre me transmitiu muitas energias positivas e sempre torceu por mim.

Às minhas queridas ajudantes, Raquel e Vanessa. Muito obrigada por toda ajuda. Vocês foram essenciais para este trabalho. Espero poder ter contribuído um pouco com a formação de vocês, assim como vocês contribuíram com a minha. Obrigada por tudo meninas. Desejo toda a felicidade e sucesso para vocês.

Aos amigos do laboratório de micotoxinas: Tai, Sabrina, Kelly, Bibiana, Antônio, Tânia, Ana, Lidi, Fernanda, Rosana, Guta, Tiago, Mariane, Adri, Carol, Lucielen e Jaque. Obrigada pela ajuda em todos os momentos. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas brincadeiras. Tudo fica mais leve e mais animado na presença de vocês.

À minha amiga especial Ana Loch. Obrigada por descomplicar o complicado. Obrigada por me mostrar caminhos, me mostrar a realidade. Obrigada pelos momentos de descontração, pelo carinho e pela amizade.

Aos membros da banca pela paciência em corrigir este trabalho e por todas as valiosas sugestões dadas. Fica aqui registrado meu agradecimento, respeito e admiração.

À Capes pelo auxílio financeiro.

“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
Resumo	2
Abstract.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
4.1 Leguminosas	7
4.2 Composição química do feijão	8
4.3 Outros compostos presentes em leguminosas.....	10
4.3.1 Compostos fenólicos	10
4.3.2 Inibidores enzimáticos.....	12
4.4 A contaminação fúngica	14
4.5 A contaminação por micotoxinas	15
4.5.1 Aflatoxinas	17
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1 Material.....	22
5.2 Amostras	22
5.3 Preparo de padrões.....	22
5.4 Composição química dos feijões	23
5.5 Determinação de compostos fenólicos	23
5.5.1 Compostos fenólicos livres (solúveis em metanol).....	23
5.5.2 Compostos fenólicos conjugados (solúveis em etanol)	24
5.5.3 Compostos fenólicos ligados (insolúveis).....	24
5.5.4 Avaliação do perfil de ácidos fenólicos	25

5.6	Determinação das proteínas solúveis	25
5.8	Estudo do mecanismo de inibição enzimática	26
5.8.1	Atividade enzimática.....	26
5.8.2	Análise Multivariada.....	26
5.8.3	Inibição enzimática de componentes do feijão	26
5.9	Determinação de AFLAS.....	27
5.10	Validação do método analítico.....	28
5.10.1	Curva analítica e linearidade	28
5.10.2	Limite de detecção do instrumento (LD _i).....	28
5.10.3	Limite de quantificação do instrumento (LQ _i)	28
5.10.4	Limites de detecção e quantificação do método (LD _m e LQ _m).....	28
5.10.5	Exatidão.....	29
5.11	Confirmação da presença de aflatoxinas.....	29
5.12	Tratamento dos dados	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1	Composição química dos feijões	31
6.2	Compostos fenólicos (CF)	32
6.3	Frações proteicas.....	38
6.5	Teste de inibição enzimática.....	41
6.6	Determinação de AFLAs	45
6.6.1	Condições cromatográficas para separação das AFLAs	45
6.6.2	Validação do método analítico para determinação de aflatoxinas	46
6.7	Ocorrência das AFLAs B1, B2 e G2 em amostras de feijão	48
6.8	Composição química e a ocorrência de AFLAs em feijões.....	52
7	CONCLUSÃO.....	55
8	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE 1	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos admissíveis de aflatoxinas em alimentos. Fonte: RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011.	19
Tabela 2 - Composição da fase móvel durante a corrida cromatográfica em LC-ESI-MS/MS.	30
Tabela 3 – Condições de fragmentação para cada micotoxina incluída no método em LC-ESI-MS/MS.	30
Tabela 4 - Composição proximal dos diferentes feijões.....	31
Tabela 5 - Teor de compostos fenólicos expressos como ácido ferúlico ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) nos diferentes feijões.	33
Tabela 6 - Perfil dos ácidos fenólicos livres das amostras de feijão.	34
Tabela 7 - Perfil dos ácidos fenólicos conjugados das amostras de feijão.	34
Tabela 8 - Perfil dos ácidos fenólicos ligados das amostras de feijão.....	35
Tabela 9 - Ácidos fenólicos predominantes nos extratos de CF em livres (solúveis em metanol), conjugados (solúveis em etanol) e ligados das amostras de feijão.....	36
Tabela 10 - Distribuição das frações albumina, globulina, prolamina e glutelina dos feijões e seus coeficientes de variação.	39
Tabela 11 - Variância explicada e correlação (R) das variáveis (compostos fenólicos e proteínas solúveis) dos componentes.	40
Tabela 12 - Percentual (%) de inibição enzimática dos extratos proteicos (feijão carioca e fradinho) e fenólicos (feijão azuki e amendoim) sobre a enzima α -amilase.	41
Tabela 13 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato fenólico do feijão azuki.	44
Tabela 14 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato fenólico do feijão amendoim.	44
Tabela 15 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato proteico do feijão carioca.....	45
Tabela 16 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato proteico do feijão fradinho.....	45
Tabela 17 - Parâmetros analíticos avaliados em HPLC-FL.	47
Tabela 18 - Percentual de recuperação das micotoxinas para os feijões branco, preto e carioca e os coeficientes de variação.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas dos compostos fenólicos avaliados neste estudo.	11
Figura 2 - Estrutura química das aflatoxinas (Han et al., 2010).	18
Figura 3 - Percentual de frequência de ácidos fenólicos predominantes nas variedades de feijões.	37
Figura 4 – ACP dos inibidores fenólicos e proteicos dos feijões.	40
Figura 5 – Inibição específica dos inibidores proteicos e fenólicos. Sendo EP-FC: extrato proteico do feijão carioca; EP-FF: extrato proteico do feijão fradinho; EF-FAz: extrato fenólico do feijão azuki; EF-FAm: extrato fenólico do feijão amendoim.	42
Figura 6 – Cromatogramas das AFLAs B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ obtidos através de HPLC-FL. Sendo 1: Segundo ponto da curva (concentrações de 8,0 ng.mL ⁻¹ para as AFLAs B ₁ e G ₁ e 0,5 ng.mL ⁻¹ para as AFLAs B ₂ e G ₂) ; 2: quinto ponto da curva (concentrações de 15,0 ng.mL ⁻¹ para as AFLAs B ₁ e G ₁ e 5 ng.mL ⁻¹ para as AFLAs B ₂ e G ₂).	46
Figura 7 - Cromatogramas de eluição do extrato de aflatoxinas obtidos através de HPLC-FL. Sendo 1: Extrato do feijão branco; 2: Extrato do feijão preto; 3: extrato do feijão carioca.	49
Figura 8 - Cromatograma de eluição do extrato de AFLAs do feijão vermelho obtidos através de HPLC-FL.	50
Figura 9 – Cromatogramas de eluição dos padrões de AFLAs e do extrato de AFLAs do feijão vermelho em LC-ESI-MS/MS. Onde: Lado esquerdo representa os padrões de AFLAS (1 mg.L ⁻¹) e as duas transições de cada composto; Lado direito representa o extrato da amostra.	51
Figura 10 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão carioca azuki.	68
Figura 11 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão carioca amendoim.	68
Figura 12 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão carioca.	69
Figura 13 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão fradinho.	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Ácidos fenólicos

AFLAs – Aflatoxinas

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária

AOAC – “Association of Official Analytical Chemists”

CF – Compostos fenólicos

HPLC-FL – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta

CL-FIE-EM/EM – Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização por Eletro spray

acoplado a Espectrometria de Massas sequencial

CV – Coeficiente de variação

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

K_M – Constante de Michaeli-Menten

LDi – Limite de Detecção do instrumento

LDm – Limite de Detecção do método

LDm – Limite de Quantificação do método

LMT – Limite máximo tolerável

LQi – Limite de Quantificação do instrumento

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OTA – Ocratoxina

p – Nível de significância

R – Correlação de Pierson

S – Substrato

V – Velocidade

$V_{MÁX}$ – Velocidade máxima

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

FEIJÕES: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS

Resumo

As leguminosas, como o feijão, são consideradas importantes fontes de nutrientes para humanos e a contaminação por fungos e consequente produção de micotoxinas pode estar diretamente influenciada pela sua composição química. Alguns compostos estão associados aos mecanismos de defesa das leguminosas atuando como inibidores de enzimas digestivas ou barreiras físicas à patógenos. É o caso dos compostos fenólicos (CF) e algumas estruturas de caráter proteico. O objetivo deste estudo foi verificar a susceptibilidade de feijões à contaminação por aflatoxinas (AFLAs), através da avaliação da presença de compostos inibidores de enzimas fúngicas. Foi realizada a validação de um método para determinação de AFLAs em feijão. Os CF livres (solúveis em metanol), conjugados (solúveis em etanol) e ligados, bem como as diferentes frações proteicas (albumina, globulina, glutelina e prolamina) foram determinadas em 10 amostras de feijão pertencentes às espécies *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* e *Vigna angularis*. O seu potencial como inibidor de α -amilase foi testado nos extratos fenólicos e protéicos. Os feijões vermelho e carioca apresentaram os maiores teores de CF totais (1766 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 1190 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente) e os feijões fradinho e branco os menores teores (183 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 192 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Os extratos de CF conjugados apresentaram os teores mais elevados de AF, onde os feijões amendoim se destacou pela maior concentração (68 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e o feijão azuki pelo menor (28 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Nos extratos de CF livres e conjugados, o ácido clorogênico foi o majoritário em 60% dos feijões analisados e nos extratos de CF ligados, o ácido ferúlico foi o majoritário em 90% dos feijões analisados. Com relação às frações proteicas solúveis, o feijão carioca apresentou o maior teor de albumina (559 mg.g^{-1}), globulina (164 mg.g^{-1}) e glutelina (325 mg.g^{-1}). Com relação à fração prolamina, o feijão preto (brasileiro e chinês) apresentou o maior teor (64 e 65 mg.g^{-1} , respectivamente), seguido pelo feijão carioca (54 mg.g^{-1}). Os limites de detecção (LD_m) obtidos para o método de determinação de AFLAs foram de 2,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 0,036 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 0,06 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para as AFLAs B_1 , B_2 e G_2 e os limites de quantificação (LQ_m) foram de 4,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFLA B_1); 0,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFLA B_2 e G_2). Não foram detectadas AFLAs B_1 , B_2 , G_1 e G_2 nos feijões analisados. Os CF dos extratos etanólicos dos feijões amendoim e azuki e os extratos contendo as proteínas solúveis em etanol dos feijões carioca e fradinho foram testados quanto ao seu potencial para inibição da α -amilase de *Aspergillus oryzae* (atividade de 4,8 mg amido hidrolisado. $\text{mg prote\u00edna}^{-1}.\text{mL}^{-1}$). O extrato proteico do feijão fradinho se destacou, pois atingiu um percentual de inibição específica de aproximadamente 56%. Os CF apresentaram uma tendência à inibição incompetitiva e os extratos proteicos não apresentaram um comportamento de inibição que permitisse definir o mecanismo de inibição. Os extratos protéicos e fenólicos dos feijões mostraram ser capazes de inibir a amilase fúngica sugerindo que este fato pode estar associado a ausência da presença de AFLAs nas amostras analisadas.

Palavras-chave: aflatoxinas, feijões, proteínas, compostos fenólicos, α -amilase.

BEANS: CHEMICAL CHARACTERISTICS AND AFLATOXINS OCCURRENCE

Abstract

Legumes, such as beans, are considered important source of nutrients for human and fungal contamination and subsequent mycotoxin production can be directly influenced by its chemistry composition. Some compounds are associated with defense mechanisms of legumes acting as inhibitors of digestive enzymes or physical barriers to pathogens. This is the case of phenolic compounds (CF) and some protein character structures. The objective of this study was to determine the susceptibility of beans to aflatoxin contamination (AFLAs), by assessing the presence of inhibitory compounds of fungal enzymes. Was performed the validation of a method for determining AFLAs in beans. The free (soluble in methanol), conjugates (soluble in ethanol) and linked CF as well as the different fractions of proteins (albumin, globulin, prolamin and glutelin) were determined in 10 samples belonging to the bean species *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* and *Vigna angularis*. Its potential as α -amylase inhibitor was tested in protein extracts and phenolic. The red and carioca beans had the highest total CF contents ($1766 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $1190 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectively) and fradinho and white beans had the lower levels ($183 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $192 \mu\text{g.g}^{-1}$). The conjugates CF extracts showed the highest levels of AF, where amendoim stood by the higher concentration ($68 \mu\text{g.g}^{-1}$) and the azuki beans at the lower level ($28 \mu\text{g.g}^{-1}$). In CF free extracts (soluble in methanol and ethanol 80%), chlorogenic acid was majority in 60% of beans analyzed and in linked CF extract, ferulic acid was majority in 90% of beans analyzed. Regarding the soluble protein fractions, carioca beans had the highest content of albumin (559mg.g^{-1}), globulin (164mg.g^{-1}) and glutelin (325mg.g^{-1}). Regarding the prolamine fraction, black beans (Brazilian and Chinese) had the highest content (64 and 65mg.g^{-1} , respectively), followed by the carioca bean (54mg.g^{-1}). The detection limits (LD_m) obtained for the method of determining AFLAs were $2.4 \mu\text{g.kg}^{-1}$; $0.036 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $0.06 \mu\text{g.kg}^{-1}$ to AFLAs B_1 , B_2 and G_2 , and the limits of quantification (LQ_m) were $4.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFLA B_1); $0.12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFLA B_2 and G_2). There were no AFLAs B_1 , B_2 , G_1 and G_2 in the analyzed beans. The CF of ethanol extracts of amendoim and azuki beans and extracts containing the soluble proteins in ethanol of carioca and fradinho beans were tested for their potential for inhibition of α -amylase from *Aspergillus oryzae* (activity hidrolisado.mg starch $4.8 \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$). The protein extract of fradinho beans stood out because it reached a percentage of specific inhibition of approximately 56%. CF showed a tendency to uncompetitive inhibition and protein extracts did not show an inhibiting define the behavior that would allow inhibition mechanism. The protein and phenolic extracts from beans proved capable of inhibiting fungal amylase suggesting that this fact may be associated with absence of the presence of AFLAs in the samples analysed.

Keywords: aflatoxins, beans, proteins, phenolic compounds, α -amylase.

1 INTRODUÇÃO

As leguminosas são consideradas a segunda família de alimentos mais importantes para os seres humanos. Dentro deste grupo estão a alfafa, a lentilha, o grão de bico, o amendoim, a soja, o tremoço, a fava e o feijão. Devido às várias possibilidades de usos industriais e também ao seu valor nutricional, as leguminosas são amplamente exploradas para obtenção de macro nutrientes, tais como proteínas, carboidratos e lipídeos. No entanto, pouco se tem avançado na exploração de seus compostos funcionais e suas aplicações para diferentes fins (GRAHAM; VANCE, 2003; RIBEIRO, 2009).

Baseado na área colhida e na produção total, as leguminosas apresentam grande importância no cenário agrícola respondendo por, aproximadamente, 27% da produção primária do mundo. No Brasil, o feijão é uma das leguminosas que se destaca pela produção e importância nutricional. As condições abióticas, tais como clima, cultivo, colheita e armazenamento destes grãos são bastante favoráveis a contaminação por fungos produtores de aflatoxinas, dentre outras micotoxinas, no entanto são poucos relatos sobre a contaminação destes grãos.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos filamentosos, as quais se caracterizam por possuir ampla faixa de toxicidade, baixo peso molecular, não imunogenicidade, além de atuarem em baixas concentrações e serem termo-estáveis. Sob condições de estresse e desbalanço de nutrientes elas podem ser produzidas sobre diversas matrizes alimentícias, como em leguminosas, se estas estiverem previamente colonizadas pelos micro-organismos (MAZIERO; BERSOT, 2010; SWEENEY; DOBSON, 1998).

Algumas micotoxinas são muito conhecidas por contaminarem cereais ou leguminosas. Dentre elas estão as produzidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, com destaque para as aflatoxinas B₁ (AFLAB₁), B₂ (AFLAB₂), G₁ (AFLAG₁), G₂ (AFLAG₂), M₁ (AFLAM₁) e M₂ (AFLAM₂). Elas são motivo de cuidados quanto ao consumo devido às suas características mutagênicas e carcinogênicas. A AFB₁, geralmente encontrada em concentrações maiores em alimentos contaminados é considerada o mais potente carcinogênico para o fígado de espécies de animais e humanos (DORS et al., 2011; RAZZAGHI-ABYANEH; SHAMS-GHAHFAROKHI; CHANG, 2011).

O crescimento fúngico e conseqüente produção de micotoxinas em alimentos podem ser influenciados pela composição da matriz, além de outras variáveis como condições

climáticas ou manejo pré e pós colheita. Alguns compostos presentes nos grãos estão demonstradamente associados à mecanismos de defesa contra possíveis patógenos e geralmente são constituídos por membros de grupos químicos diferentes como os fenólicos, terpenóides e até mesmo inibidores enzimáticos de caráter proteico. Sendo assim, é possível afirmar que a composição é determinante na interação dos fungos com os grãos, o que torna algumas espécies vegetais mais ou menos susceptíveis à contaminação (D'MELLO; MACDONALD, 1997; PAGNUSSATT et al, 2012; WINK, 2013).

Conhecer a metabolômica de variedades de feijão, quanto ao seu potencial de defesa contra agentes patogênicos ao longo da cadeia produtiva constitui uma estratégia interessante para manejo do problema micotoxicológico. Este conhecimento pode constituir subsídio para, empregando técnicas moleculares, efetivar melhoramento genético nestas e em outras espécies cultiváveis quanto à resistência ao ataque de patógenos ou investimento em processos que favoreçam o efeito destes mecanismos naturais de defesa (D'MELLO; MACDONALD, 1997; HUSSEIN, BRASEL, 2001).

Considerando que não é comum se encontrar informações sobre a ocorrência de aflatoxinas em feijões disponíveis para consumo no país e que parte do feijão comercializado é proveniente de importação de países frequentemente envolvidos com este tipo de contaminante (DING et al., 2012; LAY et al., 2015), o monitoramento da ocorrência de aflatoxinas é um aspecto a ser enfatizado neste estudo que pretende fornecer subsídios para estabelecimento de estratégias para estimar riscos de danos à saúde pública pelo consumo de feijão através de medidas para a prevenção do dano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi verificar a suscetibilidade de feijões à contaminação por aflatoxinas, através da avaliação da presença de compostos inibidores de enzimas fúngicas.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar compostos fenólicos e proteicos inibidores de α -amilase em amostras de feijão;
- Validar um método para determinação de aflatoxinas em feijão;
- Avaliar a ocorrência de aflatoxinas em feijões;
- Relacionar a possível ocorrência das aflatoxinas com os compostos funcionais presentes nestas amostras.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Leguminosas

As leguminosas são a terceira maior família de plantas superiores, com cerca de 20 mil espécies, quando comparada a outras famílias como as Gramíneas (10 mil espécies) e as Crucíferas (3500 espécies) (GEPTS et al., 2005). Baseado na área colhida e produção total, as leguminosas apresentam grande importância no cenário agrícola. Em 2004, mais de 300 milhões de grãos de leguminosas foram produzidas em 190 milhões de hectares, ou cerca de 13 % da área total cultivada incluindo terras aráveis e terras de culturas permanentes (FAOTAST, 2013). Estas respondem por, aproximadamente, 27 % da produção agrícola primária do mundo, contribuindo com 1/3 do nitrogênio proteico necessário à dieta humana e 1/3 do óleo vegetal processado (VANCE et al., 2000).

Desta maneira, as sementes de leguminosas apresentam a uma infinidade de usos industriais, nutricionais e domésticos. Em algumas partes do mundo em desenvolvimento estas sementes são a principal fonte de proteína com teor em torno de 20 % a 40 %. No entanto, em comparação com a carne, as leguminosas são deficientes em aminoácidos sulfurados e triptofano. Sendo assim, frequentemente são consumidas junto com os cereais, deficientes em lisina, a fim de complementar a dieta em termos de composição de aminoácidos (GEPTS et al., 2005, WANG et al., 2003).

Sementes de leguminosas são, também, uma importante fonte de minerais, pois podem fornecer os principais minerais essenciais requeridos pelo homem em concentrações que variam em resposta a fatores genéticos e ambientais (GRUSAK, 2002). Contudo, o componente majoritário da maior parte das sementes de leguminosas são os lipídeos. Estes compostos são frequentemente consumidos por meio de alimentos processados como manteiga, margarina ou através de óleos de cozinha (WANG et al., 2003).

O termo “leguminosa” inclui, tipicamente, os gêneros alfafa (*Medicago sativa*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Pisum sativum*), grão de bico (*Cicer arietinum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max L*), tremoço (*Lupinus*), fava (*Vicia*), e chícaro (*Lathyrus*) (RIBEIRO, 2009; VANDENBOSCH e STACEY 2003)

No Brasil, depois da soja, o feijão é a leguminosa que se destaca pela produção e pelo consumo na alimentação humana. A estimativa é que a área plantada no país durante a

safra 2014/2015 seja de 3,2 milhões de hectares. A previsão de produção para o feijão é de 3,3 milhões de toneladas com destaque para a Região Sul (CONAB, 2015).

Com relação ao mercado internacional o feijão representa um papel restrito, uma vez que quase todos os países produtores são também grandes consumidores, sendo por outro lado, pouco consumido nos países desenvolvidos do ocidente, o que limita a expansão do comércio internacional. Cerca de 3/4 da produção mundial originam-se de apenas sete países, sendo que até 2009 o Brasil foi o maior produtor, mas a partir de então a Índia e Myanmar assumiram esta posição. Ainda entre os maiores produtores surgem China, EUA, México e Argentina (CONAB, 2014).

No que se refere à preferência por tipos, variedades e classes, os hábitos alimentares são bastante diversificados entre os países e mesmo entre regiões de um mesmo país. No Brasil, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) se destaca na dieta rotineira da população. O consumo de feijão comum preto se concentra nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, sendo que para este último se destina a maior parte das importações da Argentina, Bolívia e China. Em menor escala, o consumo também abrange os estados do Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo. O feijão comum cores, por sua vez, tem o consumo concentrado nos estados centrais e em parte do Paraná e Santa Catarina (CONAB, 2014).

Nas regiões Nordeste e Norte do Brasil, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) constitui-se em um dos principais componentes da dieta alimentar, especialmente na zona rural. Devido ao seu valor nutritivo, ele é cultivado principalmente na forma de grãos secos ou verdes, visando o consumo *in natura*, na forma de conserva ou desidratada. Além disso, o caupi também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para a alimentação animal e ainda como adubação verde e proteção do solo (EMBRAPA, 2003).

Outra espécie de feijão consumido no país é a *Vigna angularis*, representada pelo feijão azuki. Não existem dados precisos sobre agricultores, sistema de produção ou área plantada deste tipo de feijão no Brasil, que é consumido principalmente em colônias japonesas como iguaria oriental. O feijão azuki é produzido principalmente na Ásia e é consumido principalmente na China, Japão e Coréia. O Japão é o maior produtor e importador de feijão azuki, onde a área plantada ocupa cerca de 100 mil hectares (RESENDE et al., 2012)

4.2 Composição química do feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma das leguminosas mais importantes, consumida no mundo inteiro como vagens de feijão verde ou sementes de feijão (TAKEOKA

et al., 2003). Além disso, é uma rica fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais para milhões de pessoas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (REHMAN; SALARIYA; ZAFAR, 2001). A sua composição pode variar entre 22-28 % de proteínas, 65-72 % de carboidratos, 4-5 % de cinzas, 1-2 % de lipídeos e 4,7-6 % de fibras (RUI et al., 2011; SHIMELIS e RAKSHIT, 2005).

A fração proteica predominante no feijão é constituída por globulinas (33,5 % a 81 %) e por albuminas (12 % a 52,4 %). (DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE, 1987; FUNK; WEDER; BELITZ, 1993). O aminoácido encontrado em maior quantidade é a lisina e em concentrações limitadas os aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (GENOVESE, 1995).

A baixa digestibilidade das proteínas do feijão, quando comparada às proteínas animais, é um dos fatores limitantes do seu valor nutricional. Ao ser avaliada em diferentes experimentos com animais situou-se entre 40 % e 70 % (SGARBIERI; ANTUNES; ALMEIDA, 1979), e com humanos, em cerca de 55 % (BRESSANI; ELÍAS; BRAHAM, 1982). Este fato pode estar relacionado à ação de fatores ligados à casca e aos cotilédones do grão de feijão, como taninos, proteínas e fitatos (BRESSANI, 1993). Após tratamento térmico, a digestibilidade proteica do feijão permanece limitada em função da alteração da estrutura primária das proteínas e pela permanência dos inibidores de protease termoestáveis como os polifenólicos. Estes interagem com as enzimas digestivas e/ou com as proteínas do feijão formando complexos e diminuindo o grau de hidrólise (NIELSEN, 1991).

Em leguminosas, como o feijão, o amido é a principal fonte de carboidratos do ponto de vista quantitativo e os oligossacarídeos, como a rafinose, estão presentes em pequenas quantidades. O teor de amido presente nos diversos cultivares de feijão, geralmente, está entre 45 % e 60 % e pode não ser totalmente utilizado como fonte energética (SATHE e DESHPANDE, 1984). Parte do amido permanece inalterada durante o processo de digestão e atinge o intestino grosso, onde é fermentado. O feijão branco, por exemplo, contém 49% de amido total, onde 16 % é digerido lentamente, 27 % é digerido rapidamente e 6 % é resistente à digestão (MENEZES; LAJOLO; LEITE, 1995).

A utilização do amido presente no feijão pode ser influenciada pela parede celular, que atua como uma barreira física, dificultando o intumescimento e completa gelatinização dos grânulos e conseqüentemente a ação de enzimas hidrolíticas (TOVAR; BJORCK; ASP, 1992). O percentual de amido resistente ainda pode ser incrementado pelo teor de taninos que

possuem atividade anti-amilásica dificultando o processo digestivo (SERRANO, GONI 2004).

O feijão constitui uma ótima opção de incremento na qualidade nutricional das dietas pelo fato de também ser uma excelente fonte de fibras (RIBEIRO et al., 2005). Estes teores podem variar de acordo com o cultivar (ANTUNES et al., 1995). Há evidências de que maiores teores de fibra alimentar podem ser encontrados em feijão de cor, onde o tipo roxo apresenta o maior teor (15,7 %), seguido pelo tipo carioca (15,2 %) e pelo tipo preto (13,1 %) (SOARES et al., 1996).

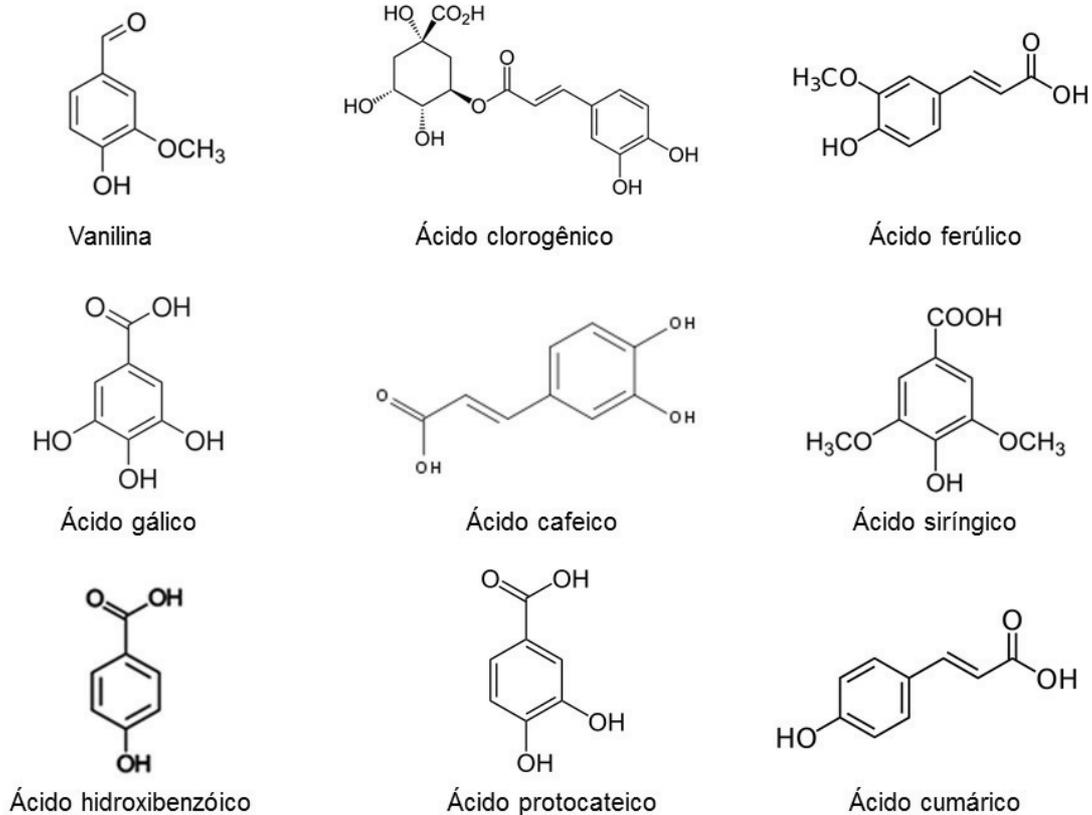
4.3 Outros compostos presentes em leguminosas

4.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (CF) são substâncias amplamente distribuídas na natureza, mais de 8000 compostos já foram detectados em plantas. Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivados de mecanismos de defesa das plantas contra agressões do ambiente (SILVA et al., 2010).

Quimicamente, os CF são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, o que propicia a versatilidade de suas estruturas e a multifuncionalidade em seus efeitos (LEE *et al.*, 2005). Eles podem se apresentar na forma livre, conjugada e ligada. Os que se apresentam na forma livre estão dentro dos vacúolos das células das plantas. Os que se apresentam na forma conjugada encontram-se esterificados com açúcares e outras moléculas de baixo peso molecular. Os ligados, por sua vez, encontram-se ligados covalentemente à componentes estruturais de parede celular como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e estruturas proteicas. Por este motivo, a extração deles deve ser conduzida de maneira diferente (WANG et al., 2015). A Figura 1 apresenta as estruturas dos compostos fenólicos estudados no presente trabalho.

Figura 1 - Estruturas dos compostos fenólicos avaliados neste estudo.



Os CF podem atuar como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários componentes das matrizes, particularmente de lipídios (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de demonstrar que vegetais, como frutas, hortaliças, grãos e especiarias, são uma fonte natural de antioxidantes fenólicos. A maioria das pesquisas sobre o tema buscam uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos, bem como limitar o uso de antioxidantes sintéticos e agentes conservadores (KAHKONEN, 1999; ZHANG, 2004; MORAES-DE-SOUZA, 2011).

Algumas plantas, ricas em compostos fenólicos, têm demonstrado à capacidade de inibir a atividade de α -amilase (PAGNUSSATT, 2011). Estas plantas vêm sendo tradicionalmente utilizadas na Índia, China e América do Sul para o controle da diabetes (ALI, 2006; MCCUE, 2004). Além disso, vem sendo demonstrado que estes compostos podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas, tais como a

aflatoxina, por atuarem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxidos e consequente estresse oxidativo que está relacionado a biossíntese de aflatoxinas (OLIVEIRA et al, 2007).

Estes aspectos justificam os estudos que têm sido realizados a fim de verificar o conteúdo de CF de alimentos. Luthiaria e Pastor-Corrales (2006) avaliaram o perfil de compostos fenólicos de diferentes classes e variedades de feijão. O ácido ferúlico, o ácido cumárico e o ácido sinápico foram os três principais CF identificados em todas as classes e variedades. O ácido cafeico, por sua vez, foi quantificado em apenas duas variedades de feijão preto. A variedade T-39 do feijão preto se destacou com uma grande quantidade de CF, onde foram encontrados quantidades de ácido cafeico (1,1 mg/ 100 g), ácido cumárico (11,6 mg/ 100g), ácido ferúlico (25,5 mg/ 100 g), e ácido sinápico (9 mg/ 100 g) totalizando, aproximadamente, 47,1 mg/ 100 g de CF.

Diferentes linhagens de feijões da espécie *Phaseolus vulgaris*, provenientes da cidade de Lavras em Minas Gerais, foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos livres (solúveis em metanol). Os teores variaram de 0,28 à 1,08 mg de ácido tânico/100g (MESQUITA et al., 2007). Silva e colaboradores (2009) avaliaram o teor de compostos fenólicos em feijões de coloração preta, marrom e branca fornecidos pela EMBRAPA. Os resultados obtidos diferiram significativamente. O feijão preto apresentou 0,93 mg de catequina/g de amostra; o feijão marrom apresentou 2,13 mg catequina/g de amostra e o feijão branco apresentou, por sua vez, 4,51 mg de catequina/g de amostra.

4.3.2 Inibidores enzimáticos

Qualquer composto que diminua a razão de hidrólise de um dado substrato é, em princípio, um inibidor enzimático (HARUTA et al., 2001). Há duas formas nas quais os inibidores podem afetar uma reação enzimática. Um inibidor reversível pode ligar-se à enzima e ser liberado em seguida, deixando-a em sua condição original. Um inibidor irreversível reage com a enzima produzindo uma proteína que deixa de ser enzimaticamente ativa de tal forma que a enzima original não pode ser regenerada (CAMPBELL; FARREL, 2007).

A indução de proteínas responsáveis por inibir algumas enzimas faz parte de um mecanismo de defesa encontrada em vegetais que, constantemente, sofrem agressões de pragas e patógenos responsáveis por perdas na agricultura e que precisam regular o estado de latência de suas sementes e órgãos de brotamento (HARUTA et al., 2001). Este aumento da defesa natural em plantas pode melhorar a produtividade agrícola e a segurança alimentar

reduzindo o uso intensivo de agrotóxicos, bem como a produção de micotoxinas nas matérias-primas (FIGUEIRA et al., 2002).

Segundo Kadozawa et al. (2006), os inibidores enzimáticos constituídos de proteínas com atividade contra amilase e protease fúngica também representam ferramentas potenciais, capazes de conter o crescimento microbiano e conseqüentemente, a produção de micotoxinas. Os inibidores de proteases encontrados em vegetais são, quase sem exceção, proteínas relativamente pequenas com pouca ou nenhuma porção de carboidratos adicionais (RICHARDSON, 1980). Tais inibidores são capazes de inibir as atividades da tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase. As pesquisas relacionadas aos inibidores de protease foram centradas, inicialmente, nos inibidores de tripsina encontrados em leguminosas, os quais foram supostamente responsabilizados pelo baixo valor nutritivo de leguminosas cruas (SILVA, SILVA, 2000).

Os inibidores de protease presentes em órgãos de reserva de vegetais, como sementes e tubérculos, atuam como agentes regulatórios de proteases endógenas, como proteínas de reserva e contra mecanismos de proteção direto contra proteases de insetos ou micro-organismos patógenos. São encontrados em paredes celulares, espaços intercelulares, no citosol e no vacúolo (TREMACOLDI, 2009).

Os inibidores de α -amilase isolados a partir de vários grãos são glicoproteínas com 15% de carboidratos em sua estrutura (RICHARDSON, 1980). Tais inibidores possuem subunidades α e β que sofrem proteólise pós-traducional. Este processo de proteólise é fundamental para que esta molécula proteica exerça atividade inibitória. Isto ocorre normalmente em cotilédones de feijões depois que a proteína é transportada para o vacúolo (PAULA, 2006). Eles ocorrem em muitos vegetais como parte dos mecanismos de defesas naturais, sendo abundantes também em cereais (BERI; GRUPTA, 2007; FRANCO et al, 2002) e legumes (GROSSI DE SÁ, 1997), de maneira que podem causar a morte de patógenos, por funcionarem como inibidores das suas amilases digestivas impedindo o aproveitamento de substrato (FENG et al., 1996).

Estudos têm sido realizados para verificar a presença de inibidores de α -amilase bem como seus efeitos em alimentos. Em feijão branco foi verificada uma inibição específica de $0,5 \text{ UIA} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ (U corresponde à formação de um μmol de açúcar por minuto). Também foi avaliado o efeito de extratos proteicos de arroz, aveia e trigo sobre amilases de diferentes fontes. A amilase extraída de *Aspergillus oryzae*, de nome comercial Fungamyl, foi a mais afetada com inibição específica de 50%, 43% e 67% para os extratos de arroz, aveia e

trigo, respectivamente. A ação antifúngica de inibidores de α -amilase é outro efeito que tem sido verificado. Inibidores de diferentes variedades de trigo foram testados sobre o crescimento de *Fusarium verticillioides*. Todos os extratos apresentaram capacidade para inibir o crescimento fúngico e uma das variedades se destacou pela inibição de 84% da atividade da α -amilase e 66% da produção de glicosamina (MENDES et al., 2013; PAGNUSSATT et al., 2012; PEREIRA et al., 2010).

4.4 A contaminação fúngica

Os fungos são organismos microbianos encontrados em todos os ambientes, constituindo milhares de espécies, e dentre eles apenas algumas sobrevivem em matrizes usadas na alimentação humana e animal (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

A contaminação dos alimentos por fungos pode resultar em alteração das características sensoriais, bem como rápida redução de qualidade e conseqüentemente a inviabilidade do uso do material contaminado (NJOBEB, 2009). Além disso, a contaminação pode representar um perigo à saúde pública, pois além de diminuir a disponibilidade de nutrientes, algumas espécies fúngica podem produzir substâncias tóxicas (MENEZES, 1992).

Os fungos frequentemente envolvidos com a cadeia alimentar humana pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, onde os parâmetros ambientais determinam as espécies dominantes. Sendo assim, *Fusarium* é comumente encontrado no campo, onde a atividade de água não é um fator limitante para a maior parte do período de crescimento da cultura, que pode continuar o seu desenvolvimento durante o armazenamento dos grãos. *Aspergillus* e *Penicillium*, pelo contrário, são mais xerofílicos podendo ser encontrados, devido ao baixo teor de umidade, durante o armazenamento dos grãos (GIORNI; MEGAN; BATTILANI, 2009; SWEENEY; DOBSON, 1998), onde podem promover uma série de injúrias. Comumente ocorre o enfraquecimento ou a morte do embrião, reduzindo a germinação e emergência das sementes (TANAKA; CORRÊA, 1981), aquecimento da massa de grãos e apodrecimento (DHINGRA, 1985), descoloração de parte ou de todo o grão, transformações bioquímicas, modificações celulares (CARVALHO; VON PINHO, 1997), e que em sua maioria atacam, principalmente, o embrião de sementes.

Por serem largamente espalhados no ecossistema, tais fungos foram isolados a partir de vários substratos alimentares, principalmente cereais e leguminosas (COSTA; SCUSSEL, 2002). Em grãos de feijão foram isolados fungos do gênero *Cladosporium spp.* (98%), *Alternaria spp.* (75%), *Aspergillus spp.* (73%), *Rhizopus spp.* (73%), *Penicillium spp.*

(69%), *Fusarium spp.* (38%), *Botrytis spp.* (27%), *Trichothecium spp.* (24%), e *Chaetomium spp.* (18%) (DOMIJAN et al., 2005).

4.5 A contaminação por micotoxinas

Micotoxinas são metabolitos secundários, produzidos por fungos filamentosos, os quais em alimentos podem ocorrer como resultado do crescimento fúngico, sendo produzidos em resposta ao estresse, desbalanço de nutrientes e condições ambientais (SWEENEY; DOBSON, 1998). Dentre as características das micotoxinas destacam-se ampla faixa de toxicidade, baixo peso molecular, não imunogenicidade, além de atuarem em baixas concentrações e de serem termo-estáveis, podendo resistir a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação. Tais tratamentos podem ser suficientes para destruírem o micélio vegetativo dos fungos que a produziram, indicando que a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Os alimentos estão susceptíveis à contaminação por diferentes espécies de fungos, e a produção de micotoxinas pode ser desencadeada por muitos fatores, mas o principal é que a espécie contaminante seja toxigênica e encontre as condições para manifestar seu potencial. Cabe salientar que fatores biológicos, como a composição do substrato, são determinantes na interação dos fungos com os alimentos e na consequente produção de micotoxinas (D'MELLO; MACDONALD, 1997). As condições ambientais de umidade do substrato e temperatura ambiente, bem como os métodos de processamento, produção e armazenamento dos produtos também são fatores muito importantes e podem ser controlados. Os fatores extrínsecos como o clima e intrínsecos como a especificidade das cepas fúngicas, por exemplo, são mais difíceis para estabelecer controle em suas variedades (D'MELLO; MACDONALD, 1997; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A ingestão de micotoxinas por humanos, que ocorre principalmente através de alimentos de origem vegetal ou de resíduos de metabólitos presentes em alimentos de origem animal pode levar principalmente à deterioração da função renal ou hepática. Algumas micotoxinas são neurotoxinas, enquanto outras agem interferindo na síntese de proteínas e podem produzir efeitos que vão desde a sensibilidade da pele ou até mesmo necrose e extrema imunodeficiência (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Os principais fungos produtores de micotoxinas são os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As micotoxinas de grande importância são produzidas pelo gênero *Aspergillus*, as AFLAs. Elas são difuranocumarinas derivadas, onde as quatro principais

AFLAs produzidas são AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂. A AFLAB₁ é geralmente encontrada em concentrações maiores em alimentos contaminados e é considerada o mais potente carcinogênico de fígado para uma grande variedade de espécies de animais, inclusive humanos. Outra importante micotoxina produzida por espécies de *Aspergillus* ou de *Penicillium* é a ocratoxina (OTA). A OTA é derivada de um isocumarina ligada a uma L-fenilalanina e também é largamente produzida por espécies de *Penicillium*. OTA é uma importante nefrotoxina, teratogênica e carcinogênica. Com relação ao gênero *Penicillium*, as três micotoxinas mais importantes produzidas são a OTA, patulina e citrinina. Têm sido reportado que a patulina pode causar efeitos adversos em fetos de roedores, bem como efeitos imunológicos, neurológicos e gastrintestinais. A citrinina, por sua vez, é conhecida como uma toxina que afeta os rins de animais domésticos, tais como porcos e cães. Dentre as micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, as mais conhecidas são os tricotecenos e as fumonisinas. Os tricotecenos são produzidos por uma grande variedade de espécies de *Fusarium*. Esse grupo de micotoxinas é imunotóxico e potente inibidor de síntese proteica, fator de grande pré-disposição a outras doenças. As fumonisinas são conhecidas por possuírem seis estruturas bem identificadas, que são FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, FA₁, e FA₂. A FB₁ possui a característica de ser hepatotóxica, e hepatocarcinogênica em ratos e também tem se mostrado como um inibidor da biossíntese de esfingolipídeos (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011; HUSSEIN; BRASEL, 2001; SWEENEY; DOBSON, 1998)

Além dos sérios problemas que causam à saúde pública, as micotoxinas também afetam o agronegócio de muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, bem como reduzindo a produção animal e agrícola (LEUNG; DIAZ-LLANO; SMITH, 2006). Sendo assim, muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de contribuir com o conhecimento sobre as micotoxinas e os principais alimentos contaminados por elas. A presença de fungos toxigênicos foi avaliada em feijões, da classe preta e de cor, de diferentes regiões do estado de Santa Catarina na região sul do Brasil. Entre os feijões de classe preta, 24,6% das cepas de *Aspergillus spp.* produziram micotoxinas. 13% das cepas produziram AFLAs e 11,5% produziram ocratoxinas. Cerca de 29% das cepas de *Penicillium* produziram citrinina. Por outro lado, 22,1% das cepas de *Aspergillus spp.* isolados de feijões de cor produziram micotoxinas. 16,7% das cepas produziram AFLAs e 5,4% produziram ocratoxinas. Enquanto que o gênero *Penicillium* teve 35,4% de citrinina produzida pelas cepas estudadas (COSTA; SCUSSEL, 2002). Cabe salientar que as micotoxinas mencionadas foram produzidas pelas espécies isoladas e cultivadas e não determinadas na própria matriz da amostra, o que sugere

que o substrato de onde as cepas foram isoladas não propiciaram a produção das toxinas pelas espécies toxigênicas.

4.5.1 Aflatoxinas

AFLAs são um grupo de metabólitos tóxicos produzidos por diferentes espécies de fungos toxigênicos. Podem ser encontradas em uma grande variedade de matrizes como em cereais, legumes, frutas, óleos, leite, carne, especiarias, etc. Dentre os principais grupos de aflatoxinas identificados, estão as produzidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, destacando-se a AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂. Outros membros importantes da família de AFLAs são a AFLAM₁ e AFLAM₂, que são formas oxidadas de AFLAB₁, modificadas no aparelho digestivo de certos animais e excretados no leite, suor, urina e fezes (RAZZAGHI-ABYANEH; SHAMS-GHAHFAROKHI; CHANG, 2011).

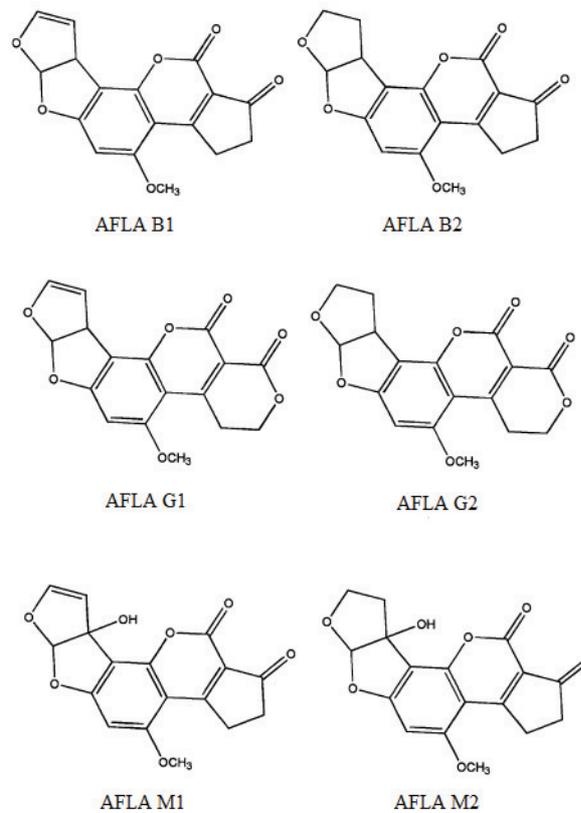
Quimicamente, as AFLAs formam um único grupo de compostos heterocíclicos oxigenados altamente complexo (furocumarinas) (Figura 2). Elas apresentam um núcleo de cumarina ligado a uma estrutura bi-furano. As AFLAs B apresentam um anel ciclopentano, o grupo M resulta de uma hidroxilação da anterior e o grupo G contém um anel de lactona na sua estrutura molecular. Devido a estas características são solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, polares como metanol, e também possuem pequena solubilidade em água. Também apresentam grande estabilidade em temperaturas elevadas, sendo pouco destruídas sob condições de cozimento normal ou pasteurização (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011; KHAYOONA et al., 2012; MCLEAN; DUTTON, 1995)

Um das hipóteses existentes para a formação da AFLAB₁ é de que a síntese começa a partir de uma unidade iniciadora de um hexanoato de 6 carbonos, como a síntese de ácidos graxos, a qual é estendida por uma poliketide sintetase até gerar um decacetídeo de 20 carbonos. Por fim, este decacetídeo é oxidado por uma enzima oxidase. A partir de uma série de mecanismos onde ocorrem reações de redução, hidratação, epoxidação, hidroxilação e orto-desmetilação a AFLAB₁ pode ser biotransformada para gerar os outros grupos de aflatoxinas (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011; TOWNSEND et al., 1991)

A AFLAB₁ é o mais tóxico e carcinogênico membro do grupo das AFLAs e geralmente é encontrado em maiores concentrações em matrizes contaminadas. O seu mecanismo carcinogênico é conhecido por afetar a membrana pericelular das células

interferindo na atividade de enzimas específicas e inibindo a síntese de RNA. As AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂ também podem ser carcinogênicas aos seres humanos. A AFLAM₁, por sua vez, apresenta toxicidade inferior a da AFLAB₁ no entanto também pode causar efeito carcinogênico, além de hepatotóxico (HAN et al., 2010; MCLEAN; DUTTON, 1995; MEERDINK, 2002).

Figura 2 - Estrutura química das aflatoxinas (Han et al., 2010).



As aflatoxinas têm sido encontradas em uma ampla variedade de alimentos. Sendo assim, para garantir a segurança da população quanto ao consumo dos mesmos, agências governamentais realizam controle da presença de AFLAs estabelecendo, para tanto, os limites máximos aceitáveis. A legislação brasileira, através da Resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 da Anvisa (Tabela 1), determinou os limites máximos para aflatoxinas em alimentos.

Tabela 1 - Limites máximos admissíveis de aflatoxinas em alimentos. Fonte: RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011.

Alimento	Aflatoxinas	LMT ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)
Leite fluido	M ₁	0,5
Leite em pó	M ₁	5
Queijos	M ₁	2,5
Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	5
Feijão	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	5
Castanhas exceto castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	10
Frutas desidratadas e secas	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	10
Castanha-do-Brasil com casca para consumo	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20
Castanha-do-Brasil sem casca para consumo	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	10
Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	15
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactantes e criança de primeira infância)	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	1
Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	1
Amêndoas de cacau	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	10
Produtos de cacau e chocolate	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	5
Especiarias	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20
Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20
Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20

LMT: Limite máximo tolerável

4.5.1.1 Determinação de AFLAs

Para a determinação de AFLAs, e outros compostos, algumas etapas importantes devem ser consideradas para confiabilidade dos resultados, como o preparo de amostra, a extração, a clarificação e a quantificação (KRSKA et al., 2005).

A extração sólido-líquido tem sido muito utilizada como técnica de preparo de amostra para a determinação de AFLAs e outras micotoxinas. O procedimento consiste,

normalmente, em pesar uma massa de amostra homogeneizada, adicionar o solvente de extração, realizar agitação e em seguida filtração. Diferentes volumes e tipos de solventes podem ser utilizados, incluindo misturas de metanol e água ou acetonitrila e água. Muitas técnicas têm sido utilizadas para o preparo de amostra, dentre elas destaca-se a dispersão da matriz em fase sólida (MSDP), que consiste em homogeneizar a amostra com um adsorvente adequado utilizando gral e pestilo. Em seguida a amostra sólida é transferida para um cartucho, onde as aflatoxinas são eluídas, seguida de etapa de concentração e injeção em equipamento para detecção e quantificação (RUBERT; SOLER; MANES, 2011; RUBERT et al., 2012). A técnica de extração com fluido pressurizado tem sido utilizada para a extração de AFLAs, sendo os solventes homogeneizados sob elevadas pressões e temperaturas com amostras sólidas e semi-sólida (SHEIBANI; GHAZIASKAR, 2009). Outra técnica utilizada para a extração de micotoxinas é a extração em fase sólida (SPE). Neste tipo de extração, os analitos, que estão solúveis em um solvente, são percolados por um cartucho contendo um sorvente no qual os analitos são retidos e em seguida são eluídos em outro solvente (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009)

A extração de AFLAs e outras micotoxinas pelo método de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) têm sido realizada para uma gama de matrizes alimentícias. Esse método apresenta como vantagem os elevados percentuais de recuperação dos analitos, remoção de possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança. (DORS et al., 2011; PRESTES et al., 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

O procedimento descrito por Soares e Rodrigues-Amaya (1989), que utiliza uma mistura de metanol e cloreto de potássio, também têm se mostrado eficiente para a extração de AFLAs, uma vez que apresentou valores de recuperação para matrizes alimentícias que obedecem as regras analíticas em vigência (PRIETTO, 2014). Além disso, este método foi modificado a fim de minimizar a utilização de amostra e solvente extrator tornando-se um procedimento acessível para as análises de rotina devido a menor geração de resíduos (HACKBART, 2014).

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção e quantificação destes contaminantes, dentre eles destacam-se as técnicas cromatográficas. A separação de AFLAs por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), emprega colunas de fase reversa e como fases móveis misturas de água, metanol e acetonitrila. Sendo assim, a etapa de clarificação, ou seja, limpeza do extrato é essencial, pois componentes da matriz podem ficar aderidos ao

sistema injetor-insensor, bem como na coluna cromatográfica reduzindo a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos (DORS et al., 2011; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011)

A fluorescência emitida pelas AFLAs sob a radiação UV pode ser usada para identificar e detectar estas micotoxinas, onde AFLAB₁ e AFLAB₂ emitem fluorescência azul (350 nm), enquanto que as AFG₁ e AFG₂ fluorescência verde (350 nm). Sendo assim, geralmente é utilizada a técnica cromatográfica com detecção por fluorescência (REITER; ZENTEK; RAZZAZI, 2009; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996) o que também viabiliza sua determinação com grande eficiência usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (HPLC-FL).

A cromatográfica líquida de alta eficiência acoplada com detector de massas (LC-MS/MS) também tem sido bastante empregada na identificação e detecção de AFLAs. Através dela é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural acerca dos analitos, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, usando (LC-MS/MS) é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas moleculares ou gerarem diferentes espectros de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008)

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

Os padrões de AFLAs (B₁, B₂, G₁ e G₂) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) com pureza > 98%. A acetonitrila e metanol (Backer) utilizados como fase móvel do sistema cromatográfico, com pureza superior a 99,9%, foram filtrados em filtro Millipore (Supelco, 58067), com poros de 0,45 µm de diâmetro. Todos os componentes da fase móvel foram previamente desgaseificados em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique, 1600 W). A água ultrapura foi obtida através do sistema Direct-Q UV3® de resistividade 18,2 MΩ cm⁻¹, Millipore, Bedford, USA. O ácido acético glacial (pureza > 99%) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu (Quioto, Japão), constituído por um sistema de bombas 26 (modelo LC-AT), forno, desgaseificador da fase móvel (modelo DGU), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i), detector de UV (SPD-20A) e detector de fluorescência (modelo FL – 10AXL).

5.2 Amostras

As leguminosas avaliadas foram 10 tipos de feijões pertencentes à 3 espécies diferentes, escolhidas conforme perfil de consumo na região sul do RS. Dentre estas espécies está o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), caupi (*Vigna unguiculata*) e azuki (*Vigna angularis*). Pertencente à espécie *Phaseolus vulgaris* foram coletados os feijões preto, branco, carioca, amendoim, jalo, vermelho e o feijão preto produzido na China e importado para o Brasil. Da espécie *Vigna unguiculata* foram coletados os feijões fradinho e rajado. Pertencente à espécie *Vigna angularis* foi coletado o feijão azuki. Os feijões foram coletados aleatoriamente no comércio local, em feiras livres e o feijão preto importado da China foi cedido pela EMATER (safra 2013).

Os feijões foram coletados, moídos e peneirados, empregando-se a fração granulométrica de 0,5 mm, padronizada para a caracterização físico-química.

5.3 Preparo de padrões

As soluções padrão de aflatoxinas foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em mistura de benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). As concentrações teóricas das soluções estoque foram de 0,1 mg.mL⁻¹ para as AFLAs (B₁, B₂, G₁ e G₂), separadamente. Esses padrões foram diluídos para o preparo de soluções trabalho, de forma a obter concentrações

10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções foram secas sob atmosfera de nitrogênio e ressuspendidas em metanol para a determinação das concentrações exatas que foram determinadas em espectrofotômetro (Bioespectro – espectrofotômetro SP-220), em comprimentos de onda de 360 nm para a AFLAB₁ e 362 nm para as demais. Para a estimativa das concentrações (Equação 1) foram utilizados os valores de absorvidade molar (ϵ) 19800, 20900, 17100, 18200 $\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂, respectivamente. Todas as soluções foram armazenadas a -18°C (AOAC, 2000).

$$\mu\text{g micotoxina.mL}^{-1} = \text{abs} * \text{PM} * 1000 * \text{FC} * \epsilon^{-1} * b^{-1} \quad (1)$$

Onde:

abs = valor da absorvância da solução padrão;

PM = peso molecular da micotoxina em estudo;

FC = fator de correção do instrumento;

ϵ = absorvidade molar no comprimento de onda da absorção característica de cada micotoxina.

b = largura da cubeta (cm)

5.4 Composição química dos feijões

A composição proximal foi determinada segundo métodos descritos pela AOAC (2000). A umidade foi determinada pelo método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C (nº 935.29); os lipídios pela extração com éter de petróleo (nº 920.85); os níveis proteicos pelo método de micro-Kjeldahl (nº 920.87) convertidos com fator 6,25 e as cinzas pelo método gravimétrico através de incineração das amostras em mufla a 550°C (nº 923.03). Os carboidratos foram determinados por diferença.

5.5 Determinação de compostos fenólicos

5.5.1 Compostos fenólicos livres (solúveis em metanol)

A extração dos compostos fenólicos livres foi realizada nos diferentes cultivares de feijão segundo método descrito por Souza *et al.* (2009), a partir da adição de 10 mL de metanol em 3 g de amostra. A mistura foi agitada em mesa agitadora orbital a 200 rpm durante 1 h à temperatura ambiente (25°C). A agitação foi interrompida durante 15 min, foram acrescentados mais 10 mL de metanol e a mistura permaneceu por mais 90 minutos sob

agitação. O extrato foi centrifugado a $3.220 \times g$ e filtrado, clarificado com 5 mL de hidróxido de bário 0,1 M e 5 mL de sulfato de zinco 5 %, deixado em repouso durante 30 minutos, centrifugado a $3.220 \times g$ durante 5 min e clarificado novamente. Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com metanol. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Souza *et al.* (2009), utilizando curva padrão de ácido ferúlico ($1,8 - 9,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.5.2 Compostos fenólicos conjugados (solúveis em etanol)

A extração dos compostos fenólicos solúveis conjugados foi realizada nos diferentes cultivares de feijão segundo método descrito por Mira *et al.* (2009) com adaptações. Tal extração consistiu em adicionar etanol 80% em 3 g de amostra, homogeneizar em mesa agitadora orbital a 200 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), centrifugar a $3.220 \times g$ durante 10 minutos a $10 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi filtrado e recolhido em balão de 25 mL. O procedimento de extração foi repedido mais duas vezes e o volume do balão foi completado a 25 mL com etanol 80%. A quantificação foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Souza *et al.* (2009) adaptado para este trabalho, utilizando curva padrão de ácido ferúlico ($4,2 - 12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.5.3 Compostos fenólicos ligados (insolúveis)

A extração dos compostos fenólicos ligados foi realizada segundo método descrito por Mira *et al.* (2009) com adição de 10 mL de hexano ao resíduo resultante da extração dos compostos fenólicos solúveis em etanol. A mistura foi levada a mesa agitadora orbital a 200 rpm durante 10 min em temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a $3.220 \times g$ por 20 min a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 60 mL de NaOH 4 M e a solução foi levada a mesa agitadora orbital a 200 rpm durante 4 horas em temperatura ambiente. O pH do meio foi baixado a 1,0 adicionando HCl 6 M. A solução foi centrifugada a $3.220 \times g$ durante 40 min a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, filtrada para funil de separação onde foram acrescentados 30 mL de acetato de etila. A partição foi repetida mais duas vezes e a fração acetálica foi recolhida em erlenmeyer e a ela foi adicionado aproximadamente 10 cm^3 de sulfato de sódio anidro para auxiliar na separação das fases orgânica e aquosa. A fração aquosa foi retirada e a fração acetálica, contendo os compostos fenólicos, foi evaporada em rota-evaporador a $55 \text{ }^\circ\text{C}$. O resíduo foi ressuscendido em 10 mL de etanol 80% e a

quantificação foi realizada conforme Souza *et al.* (2009), utilizando curva padrão de ácido ferúlico (4,2 – 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.5.4 Avaliação do perfil de ácidos fenólicos

O perfil dos compostos fenólicos dos feijões também foi determinado através de HPLC-UV. Um volume de 5 mL de cada extrato foi seco sob atmosfera de nitrogênio e ressuspendido em uma fase móvel composta por metanol:água acidificada com ácido acético (1 %) na proporção 20:80. A coluna utilizada foi uma Supelco C18 com dimensões de 4,6 x 250 mm e com tamanho de partícula de 10 μm . A vazão de fase móvel utilizada foi de 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em tempo de corrida de 25 min e a temperatura do forno foi de 35 °C. A detecção foi realizada de modo que nos primeiros 15 min foi utilizado o comprimento de onda de 280 nm para detecção dos ácidos gálico, protocateico, clorogênico, hidroxibenzóico, cafeico, seríngico e vanilina. Nos 10 min restantes foi utilizado o comprimento de onda de 350 nm para detectar os ácidos cumárico e ferúlico (SCAGLIONI *et al.*, 2014).

5.6 Determinação das proteínas solúveis

A extração das proteínas solúveis foi realizada com base na solubilidade das diferentes frações proteicas (albumina, globulina, prolamina e glutelina), que foram separadas por extração sequencial de acordo com a solubilidade em água, cloreto de sódio, etanol e hidróxido de sódio. Inicialmente foram adicionados 10 mL de água destilada a 1 g de amostra, seguido por agitação em mesa agitadora orbital durante 30 min à 180 rpm e 25 °C. As amostras foram centrifugadas à 3.220 \times g durante 20 min e o sobrenadante foi coletado, repetindo-se o procedimento para obtenção da fração albumina. Ao resíduo da extração anterior foram adicionados 10 mL de NaCl 1 % para a obtenção da fração globulina, de forma semelhante ao descrito anteriormente. O mesmo ocorreu para as extrações de prolamina e glutelina, utilizando etanol 70% e NaOH (0,1 mol L^{-1}) respectivamente (OSBORNE, 1924).

A quantificação das frações protéicas separadas pela solubilidade foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando curva padrão de albumina solubilizada em água (0,018 – 0,18 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), NaCl 1% (0,018 – 0,18 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), etanol 70% (0,018 – 0,18 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e NaOH (0,018 – 0,18 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.8 Estudo do mecanismo de inibição enzimática

5.8.1 Atividade enzimática

A atividade inicial da α -amilase fúngica produzida por *Aspergillus oryzae* (Fungamyl® 800L, CEE 2006/121, Novozymes Latin America, Paraná, Brasil) foi determinada pelo método iodométrico (BARAJ; GARDA-BUFFON; BADIALE FURLONG, 2010). O experimento foi conduzido de maneira que foram utilizados os seguintes reagentes:

- (1) 1 mL de amido 0,5% e 2 mL de tampão acetato de sódio pH 7 suplementado com cloreto de sódio e cloreto de potássio;
- (2) 1 mL de amido 0,5%, 1 mL de tampão pH 7 e 1 mL de HCl 0,1 N;
- (3) 1 mL de amido 0,5%, 1 mL de tampão pH 7 e 1 mL de enzima;
- (4) 2 mL de tampão pH 7 e 1 mL de enzima.

A reação enzimática foi interrompida após 30 minutos, pela adição de 1 mL de HCl 0,1 N nos reatores 1, 3 e 4 e no reator 2 foi adicionado 1 mL de enzima. O amido residual foi medido por iodometria através da adição de 0,1 mL de iodo 0,3% (em solução de KI 3%). Após 15 minutos foram adicionados 5,9 mL de água destilada nos tubos reatores e o complexo formado foi quantificado em espectrofotômetro (Bioespectro – espectrofotômetro SP-220) a 620 nm usando uma curva padrão de amido ($2 - 15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os tubos reatores 1 e 4 foram utilizados para controlar as condições de atuação do amido e da enzima, respectivamente. A atividade específica da enzima (UA) foi estimada pela Equação 2:

$$\text{UA } \alpha\text{-amilase} = \frac{\text{conc. inicial de amido} - \text{conc. final de amido}}{\text{mg proteína} \cdot \text{min}} \quad (2)$$

5.8.2 Análise Multivariada

Para verificar a distribuição de compostos proteicos e fenólicos extraídos dos 10 diferentes feijões e escolher quais utilizar no teste de inibição enzimática foi realizada uma análise de componentes principais (ACP), onde foi utilizado uma matriz de correlação. Esta análise foi realizada com o *Software Past*.

5.8.3 Inibição enzimática de componentes do feijão

A constatação da inibição enzimática foi estimada pela determinação da concentração de substrato necessária para a reação atingir a metade da velocidade máxima (K_M) e pela determinação da velocidade máxima de reação, considerada a quantidade de

substrato hidrolisado pela enzima na ausência do inibidor ($V_{MÁX}$). Estes parâmetros cinéticos foram avaliados *in vitro*. A reação enzimática foi efetuada na ausência e na presença de diferentes alíquotas dos inibidores enzimáticos (proteicos e fenólicos) e em concentrações variadas de substrato. As alíquotas de inibidores utilizadas foram de 0,5 mL (51 µg de proteína solúvel do feijão carioca; 8 µg de proteína solúvel do feijão fradinho; 23 µg de CF do feijão azuki e 90 µg de CF do feijão amendoim), 1,0 mL (102 µg de proteína solúvel do feijão carioca; 16 µg de proteína solúvel do feijão fradinho; 46 µg de CF do feijão azuki e 181 µg de CF do feijão amendoim) e 1,5 mL (153 µg de proteína solúvel do feijão carioca; 24 µg de proteína solúvel do feijão fradinho; 69 µg de CF do feijão azuki e 271 µg de CF do feijão amendoim). Primeiramente, os inibidores foram incubados com a enzima α -amilase (Fungamyl) durante 15 min. Em seguida foi adicionado o tampão acetato de sódio pH 7 e as diferentes alíquotas de substrato (0,25 mL; 0,5 mL; 0,75 mL e 1,0 mL) (PAGNUSSATT et al., 2012).

A linearização da equação de Michaelis-Menten permitiu determinar a velocidade máxima de reação, bem como a Constante de Michaelis-Menten (K_M). Esta linearização foi realizada de forma que $1/V$ tomou o lugar da coordenada y e $1/[S]$, o lugar da coordenada x gerando a equação da reta ($y=mx + b$). A inclinação da reta, m , corresponde a $K_M/V_{máx}$, e a intersecção, b , corresponde a $1/V_{máx}$ (CAMPBEL; FARREL, 2007).

5.9 Determinação de AFLAS

A extração das AFLAS B₁, B₂, e G₂ foi realizada segundo método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) adaptado por Hackbart (2014) e Prietto (2014). A 10 g de amostra foram adicionados 60 mL de metanol:cloreto de potássio 4% na proporção 9:1. A mistura foi levada para agitação em blender por 2 min, seguida por interrupção de 1 min e agitação por mais 2 min, foi filtrada e foram recolhidos 30 mL de extrato. Este extrato foi clarificado pela adição de 30 mL de sulfato de amônio 30 % e aproximadamente 10 cm³ de celite. Após repouso de 5 min a mistura foi filtrada e 30 mL de extrato foi recolhido para funil de separação e adicionados 30 mL de água destilada. Em seguida foram realizadas 3 partições com 10 mL de clorofórmio e o solvente foi evaporado em banho-maria à 80 °C.

A quantificação das AFLAS foi realizada utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu – CTO-20AC) acoplado a um detector de fluorescência (excitação à 350 nm e emissão à 450 nm). Foi utilizada uma coluna Kromasil C18 de dimensões 4,6 x 250 mm e tamanho de partícula de 5 µm. Como fase móvel foi utilizado uma mistura de água

acidificada com ácido acético (1 %), acetonitrila e metanol na proporção de 60:5:35, a uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹, temperatura da coluna de 35 °C e o tempo de corrida de 20 min (HACKBART et al., 2014).

5.10 Validação do método analítico

A validação do método para determinação de AFLAS B₁, B₂ e G₂ em feijão foi realizada empregando as seguintes figuras analíticas de mérito: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

5.10.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade do instrumento foi avaliada pela construção da curva analítica através da dissolução de padrões das AFLAS B₁, B₂, G₁ e G₂ na mistura de solventes que compõe a fase móvel em concentrações crescentes e em triplicata. Para a AFLA B₁ e G₁ as concentrações dos padrões foram 4,0; 8,0; 10,0; 12,0; 15,0 e 20,0 mL.min⁻¹ e para as aflatoxinas B₂ e G₂ foram 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 mL.min⁻¹. Foram determinados a faixa de linearidade, os coeficientes de determinação e correlação e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

5.10.2 Limite de detecção do instrumento (LD_i)

O LD_i foi determinado mediante injeções de uma mistura de soluções dos padrões das AFLAs diluídas na mistura de solventes que compõe a fase móvel em concentrações decrescentes até obtenção de uma relação de 3:1 entre o pico do analito e o ruído da linha de base nas proximidades do tempo de retenção do pico das aflatoxinas.

5.10.3 Limite de quantificação do instrumento (LQ_i)

O LQ_i foi determinado mediante injeções de uma mistura de soluções dos padrões das AFLAs diluídas na mistura de solventes que compõe a fase móvel em concentrações decrescentes até obtenção de uma relação de 10:1 entre o pico do analito e o ruído da linha de base nas proximidades do tempo de retenção do pico das aflatoxinas.

5.10.4 Limites de detecção e quantificação do método (LD_m e LQ_m)

Os limites de detecção e quantificação do método foram estimados com base nas diluições do procedimento de preparo da amostra.

5.10.5 Exatidão

A exatidão (recuperação) foi avaliada segundo a ANVISA (2003), através da fortificação das amostras com solução padrão de aflatoxinas em 3 níveis de concentração, sendo eles: 14,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 18 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 24 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para aflatoxina B₁ e 3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para as aflatoxinas B₂ e G₂. O percentual de recuperação foi calculado conforme a Equação 3.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

C1: Concentração determinada após a fortificação

C2: Concentração determinada na amostra não fortificada (branco)

C3: Concentração de padrão adicionado na fortificação

5.11 Confirmação da presença de aflatoxinas

Os extratos de AFLAs dos feijões foram submetidos a análise em HPLC acoplado a detector de massas (LC-ESI-MS/MS) a fim de confirmar a presença de AFLAs na amostra. O cromatógrafo utilizado foi Cromatógrafo Líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, Sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 μm 144 Å (50 \times 3 mm d.i.).

A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila:H₂O ultrapura ambos com 0,1% de ácido acético com eluição no modo gradiente e vazão de 0,4 mL min⁻¹. As condições do gradiente estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição da fase móvel durante a corrida cromatográfica em LC-ESI-MS/MS.

Tempo (min)	ACN* acidificada (%)	H ₂ O acidificada (%)
0	18	82
3	45	55
3,8	100	0
4,3	18	82
10	18	82

*ACN: acetonitrila

A temperatura da fonte empregada foi de 120 °C, a temperatura do gás de dessolvatação foi de 400 °C e as vazões do gás nitrogênio para dessolvatação da amostra e para o cone da amostra, respectivamente 500 e 100 L h⁻¹ (HACKBART, 2013).

As micotoxinas incluídas no método e as condições de fragmentação podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de fragmentação para cada micotoxina incluída no método em LC-ESI-MS/MS.

Micotoxina	Massa Molar	ESI	Transição (<i>m/z</i>)		Energia de colisão (eV)
			Íon precursor →	Íon produto	
AFLA B ₁	312,3	+	313>241*	45	37
			313>285	45	20
AFLA B ₂	314,3	+	315>259	45	30
			315>287*	45	25
AFLA G ₁	328,3	+	328.8>243.4*	43	20
			328.8>311.2	43	25
AFLA G ₂	330,3	+	331>189	45	40
			331>313*	45	25

*Transições utilizadas para quantificação.

5.12 Tratamento dos dados

Os resultados das determinações de composição e do contaminante foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com 95% de confiança, sendo que foram utilizados os valores das triplicatas de cada experimento.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Composição química dos feijões

A contaminação dos alimentos por fungos e consequente produção de micotoxinas pode estar diretamente influenciada pela composição da matriz (D'MELLO; MACDONALD, 1997). Sendo assim, os feijões foram primeiramente caracterizados quanto aos componentes majoritários (Tabela 4). Os resultados foram avaliados estatisticamente quanto à significância das diferenças entre os componentes dos feijões das diferentes variedades.

A composição proximal dos feijões foi similar à descrita pela literatura (MESQUITA et al., 2007; SILVA, ROCHA, CANNIATTI BRAZACA, 2009). A variação observada entre os teores dos diferentes componentes pode ser decorrente das regiões de produção de cada espécie e das suas condições características de clima, temperatura, e propriedades físicas e químicas do solo (PIRES et al., 2005). Estas variáveis podem afetar de maneira diferenciada os processos fisiológicos como respiração, fotossíntese, síntese de proteínas e metabolismo de lipídeos e originar grãos com composições diferentes e consequentemente propriedades tecnologicamente funcionais distintas.

Tabela 4 - Composição proximal dos diferentes feijões.

Cultivar de Feijão	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos* (%)
Preto	14,0 ^{ab} (0,7)	4,6 ^{bc} (2,3)	20,3 ^{ce} (10,3)	1,72 ^b (13,7)	59,6 ^{abc} (3,4)
Carioca	14,0 ^{ab} (1,7)	3,9 ^e (0,1)	22,5 ^{cde} (1,5)	0,74 ^c (4,9)	58,8 ^{abc} (0,8)
Vermelho	16,7 ^a (4,3)	4,7 ^b (2,0)	27,0 ^{ab} (6,4)	1,9 ^b (1,0)	49,6 ^e (4,4)
Branco	12,3 ^{ab} (1,7)	5,1 ^a (1,6)	27,8 ^a (3,4)	0,54 ^c (2,8)	54,2 ^{de} (1,9)
Chinês	13,6 ^{ab} (4,0)	4,2 ^d (1,0)	24,4 ^{abc} (1,3)	2,54 ^a (10,3)	55,3 ^{cde} (1,5)
Amendoim	14,1 ^{ab} (2,5)	3,6 ^f (2,7)	18,9 ^e (1,9)	2,6 ^a (11,4)	60,8 ^{ab} (1,0)
Jalo	11,1 ^{ab} (15,0)	3,7 ^{ef} (0,7)	23,5 ^{bcd} (11,3)	2,56 ^a (15,7)	55,7 ^{bcd} (7,5)
Rajado	10,5 ^b (1,9)	4,4 ^{cd} (2,3)	21,8 ^{cde} (4,8)	1,67 ^b (17,0)	61,7 ^a (1,8)
Fradinho	13,6 ^{ab} (0,6)	3,2 ^g (1,9)	21,8 ^{cde} (2,3)	2,02 ^{ab} (18,8)	59,5 ^{abcd} (1,0)
Azuki	10,6 ^b (1,5)	4,3 ^d (2,6)	22,8 ^{cd} (1,3)	0,28 ^c (3,5)	62,0 ^a (0,4)

*Carboidratos estimados por diferença. Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$

A composição dos feijões confirmou que eles constituem uma importante fonte de nutrientes. Os feijões vermelho, branco e chinês se destacaram com os maiores teor de proteínas (27 %, 27,8 % e 24,4 % respectivamente), enquanto o feijão branco apresentou o

maior teor de cinzas (5,1 %). Com relação ao teor de lipídeos, os feijões azuki, branco e carioca apresentaram os menores teores (0,3 %, 0,5 % e 0,7 % respectivamente) enquanto que os feijões chinês, amendoim e jalo apresentaram os maiores (2,5 %, 2,6 % e 2,6 % respectivamente). Os feijões apresentaram teores de proteínas, cinzas e lipídeos similares aos descritos pela literatura para outras leguminosas tais como a lentilha (26,6 % de proteínas, 3,4 % de cinzas e 1 % de lipídeos) (HEFNAWY, 2011).

Segundo o Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA, 2008), teores elevados de umidade causam aumento da temperatura da massa dos grãos em virtude de processos respiratórios que favorecem o desenvolvimento de micro-organismos como fungos e também insetos. Sendo assim, o limite máximo recomendado para a umidade do grão de feijão colhido deve ser uniformizado a aproximadamente 14%. A amostra de feijão vermelho apresentou teor de umidade ligeiramente superior a este limite, o que poderia torná-lo mais susceptível à contaminação fúngica e conseqüente produção de micotoxinas.

6.2 Compostos fenólicos (CF)

Os compostos fenólicos estão associados aos mecanismos de defesa dos grãos contra contaminação fúngica atuando como inibidores enzimáticos ou barreira física para patógenos (Oliveira et al., 2007). No caso deste estudo foram determinados os compostos fenólicos livres (solúveis em metanol), conjugados (solúveis em etanol 80%) e ligados (insolúveis) nas diferentes amostras de feijões. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Os CF livres (solúveis em etanol 80 % v/v) foram os que se destacaram pela quantidade em todas as variedades de feijão, sendo o feijão vermelho o que apresentou a maior concentração (1410 μg ác. ferúlico.g⁻¹), enquanto que o feijão fradinho apresentou a menor concentração (103 μg ác. ferúlico.g⁻¹). Outros estudos reportaram maiores e menores concentrações de CF em feijões. Guajardo-Flores et al. (2013) encontraram 30000 μg ác. gálico.g casca de feijão preto⁻¹; enquanto Xu et al. (2007) encontraram uma variação de 570-6990 μg ác. gálico.g feijão⁻¹. Garcia-Lafuente et al. (2014) avaliaram o teor de CF em feijão branco e vermelho e obtiveram concentrações de 4630 μg ác. gálico.g amostra⁻¹ e 13410 μg ác. gálico.g⁻¹, respectivamente.

Tabela 5 - Teor de compostos fenólicos expressos como ácido ferúlico ($\mu\text{g.g}^{-1}$) nos diferentes feijões.

Feijão	CF livres	CF conjugados	CF ligados	Total
Preto	94,6 ^e (2,1)	359,8 ^d (0,8)	83,4 ^e (0,1)	490,5 ^d (0,8)
Carioca	119,6 ^d (0,6)	807,7 ^c (0,7)	323,1 ^a (0,7)	1190,0 ^b (1,0)
Vermelho	484,5 ^a (2,3)	1410,4 ^a (4)	234,3 ^{bc} (1,6)	1765,8 ^a (4,6)
Branco	29 ^h (3,5)	126,4 ^e (7,6)	37,0 ^f (4,5)	192,1 ^e (8,3)
Chinês	62,7 ^{fg} (1,9)	156,2 ^e (1,4)	105,9 ^{de} (3,1)	293,4 ^e (0,5)
Amendoim	127 ^{cd} (0,7)	603,4 ^c (5,4)	205,1 ^c (5,5)	872,0 ^c (6,5)
Jalo	141,5 ^c (3,2)	566,0 ^c (7,1)	135,4 ^d (3,1)	772,1 ^c (7,7)
Rajado	178,5 ^b (5,9)	465,3 ^d (1,1)	249,5 ^b (5,1)	804,1 ^c (3,4)
Fradinho	43,5 ^{gh} (2,7)	102,7 ^e (0,9)	37,2 ^f (3,4)	183,4 ^e (0,7)
Azuki	74,4 ^{fg} (4,9)	149,3 ^e (1,9)	82,5 ^e (5,4)	269,0 ^e (1,8)

Resultados expressos com média e coeficiente de variação (CV%). Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$.

Estudos mostraram que grãos pigmentados possuem maior concentração de CF do que aqueles com sementes de cor clara (Barampama; Simard, 1993; Sutivisedsak et al, 2010). Esta tendência também foi verificada neste trabalho, onde os feijões da classe cores, com destaque para o vermelho e o carioca, apresentaram os maiores teores de CF totais ($1766 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $1190 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente) enquanto que os feijões da classe branca (feijão branco) e preta (feijão preto e preto chinês) apresentaram os menores teores ($192,1 \mu\text{g.g}^{-1}$; $490,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $293,4 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente). Por serem os CF relacionados aos mecanismos de defesa, da mesma forma que os outros compostos, os níveis encontrados são afetados por variáveis bióticas e abióticas (MOJICA et al., 2014). No entanto, é muito difícil encontrar dados da literatura para fazer uma comparação, particularmente considerando que os conteúdos nos extratos são determinados baseados em diferentes fundamentos para extração.

A avaliação do perfil dos CF em uma matriz é de extrema importância, tendo em vista que muitas propriedades como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antimutagênica que já foram demonstradas e atribuídas à ácidos fenólicos (APARICIO-FERNÁNDEZ et al., 2005; GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014; MEGDICHEKSOURI et al., 2015; KAMATOU; VILJOEN; STEENKAMP., 2010). Sendo assim, a separação, identificação e quantificação dos ácidos fenólicos (AF) presentes nos feijões foram realizadas (Tabelas 6, 7 e 8).

Tabela 6 - Perfil dos ácidos fenólicos livres das amostras de feijão.

Feijão	AF livres ($\mu\text{g.g}^{-1}$)										Total
	Gálico	Protocateico	Clorogênico	Hidroxi benzóico	Cafeico	Siríngico	Vanilina	Cumárico	Ferúlico	Total	
Preto	2,99	0,42	3,03	0,30	3,08	< LQ	< LQ	< LQ	0,91	10,7	
Branco	0,77	< LQ	8,73	0,34	3,10	< LQ	< LQ	0,44	0,71	14,1	
Carioca	0,69	< LQ	1,61	0,43	< LOQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,08	3,8	
Vermelho	0,73	0,00	1,05	1,60	0,00	12,71	0,36	1,43	2,91	20,8	
Amendoim	2,19	1,38	1,38	0,83	0,00	0,00	< LQ	1,01	1,48	8,3	
Fradinho	0,00	0,00	4,26	< LQ	0,00	< LQ	< LQ	< LQ	1,44	5,7	
Azuki	0,00	1,04	0,81	< LQ	0,00	< LQ	< LQ	0,47	0,00	2,3	
Jalo	0,92	0,14	4,46	1,21	0,00	< LQ	< LQ	1,70	3,24	11,7	
Rajado	0,00	0,00	2,50	< LQ	0,00	0,00	< LQ	0,40	0,34	3,2	
Chinês	< LQ	0,67	3,40	0,48	2,02	0,98	< LQ	0,62	2,35	10,5	

Tabela 7 - Perfil dos ácidos fenólicos conjugados das amostras de feijão.

Feijão	AF conjugados ($\mu\text{g.g}^{-1}$)										Total
	Gálico	Protocateico	Clorogênico	Hidroxi benzóico	Cafeico	Siríngico	Vanilina	Cumárico	Ferúlico	Total	
Preto	0,00	4,37	19,32	1,27	7,71	0,21	0,00	0,27	< LQ	33,1	
Branco	0,00	1,97	40,03	0,00	7,06	0,00	0,14	0,77	1,92	51,9	
Carioca	0,00	10,82	6,98	0,00	8,78	0,00	0,12	< LQ	3,09	29,8	
Vermelho	11,34	12,74	5,98	0,96	3,52	0,00	< LQ	2,17	3,34	40,0	
Amendoim	33,99	16,17	5,62	0,00	7,19	0,00	0,00	1,63	3,59	68,2	
Fradinho	0,00	2,37	14,10	2,23	1,38	0,00	0,73	6,72	6,09	33,6	
Azuki	15,89	< LQ	6,11	0,00	1,94	0,00	1,89	1,60	0,43	27,9	
Jalo	8,71	4,17	16,03	1,59	2,79	0,00	0,65	2,96	5,74	42,6	
Rajado	11,16	10,26	18,33	1,39	4,76	0,00	0,50	0,68	0,74	47,8	
Chinês	0	7,54	24,48	0	9,73	0,98	0	1,16	7,5	51,4	

Tabela 8 - Perfil dos ácidos fenólicos ligados das amostras de feijão.

Feijão	AF ligados ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										Total
	Gálico	Protocateico	Clorogênico	Hidroxi benzóico	Cafeico	Siríngico	Vanilina	Cumárico	Ferúlico		
Preto	1,13	1,50	< LQ	0,96	< LQ	3,37	0,00	2,04	9,99	19,0	
Branco	0,00	< LQ	< LQ	< LQ	1,20	< LOQ	< LQ	5,93	11,07	18,2	
Carioca	0,57	5,54	0,00	11,58	0,00	0,00	1,35	3,60	19,86	42,5	
Vermelho	5,46	11,69	< LQ	9,93	1,35	0,00	2,59	7,23	14,96	53,2	
Amendoim	< LQ	3,94	< LQ	2,61	1,52	0,00	0,92	6,94	12,95	28,9	
Fradinho	< LQ	< LQ	< LQ	2,26	< LQ	< LQ	< LQ	9,98	12,99	25,2	
Azuki	3,32	8,30	< LQ	0,59	0,87	< LQ	< LQ	14,66	< LQ	27,7	
Jalo	0,87	3,92	< LQ	4,08	0,85	0,00	1,08	5,66	10,14	26,6	
Rajado	0,00	0,00	1,29	5,16	2,79	0,00	3,73	11,20	17,72	41,9	
Chinês	7,84	1,79	0,00	0,94	2,29	9,95	0,00	3,24	19,83	45,9	

Os limites de detecção do instrumento para os ácidos gálico, protocateico, clorogênico, hidroxibenzóico, cafeico, siríngico, vanilina, cumárico e ferúlico foram de 0,12; 0,27; 0,41; 0,32; 0,24; 0,25; 0,18; 0,19 e 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

O somatório dos ácidos fenólicos (AF) encontrados nos extratos dos feijões foi inferior ao estimado pela quantificação espectrofotométrica. Isso se deve ao fato do mesmo quantificar outros compostos da família fenóis que são extraídos com os solventes empregados.

Os extratos de CF conjugados (solúveis em etanol 80%) apresentaram, para a maioria dos feijões, um teor mais elevado de AF do que os extratos de compostos fenólicos livres (solúveis em metanol) e ligados, onde o feijão amendoim, pertencente à variedade *Phaseolus vulgaris*, se destacou pelo maior teor de AF (68 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e o feijão azuki (variedade *Vigna angularis*) pelo menor teor (28 $\mu\text{g.g}^{-1}$). O perfil de AF dos feijões variou de acordo com o solvente extrator (Tabela 9), sendo que nos extratos metanólicos os AF predominantes foram o clorogênico, o protocateico, o gálico, o siríngico e o cafeico. Os ácidos predominantes nos extratos etanólicos foram o ácido clorogênico, o gálico e protocateico. Nos extratos contendo os compostos fenólicos ligados foram encontrados em maiores quantidades os ácidos ferúlico e o cumárico.

Tabela 9 - Ácidos fenólicos predominantes nos extratos de CF em livres (solúveis em metanol), conjugados (solúveis em etanol) e ligados das amostras de feijão.

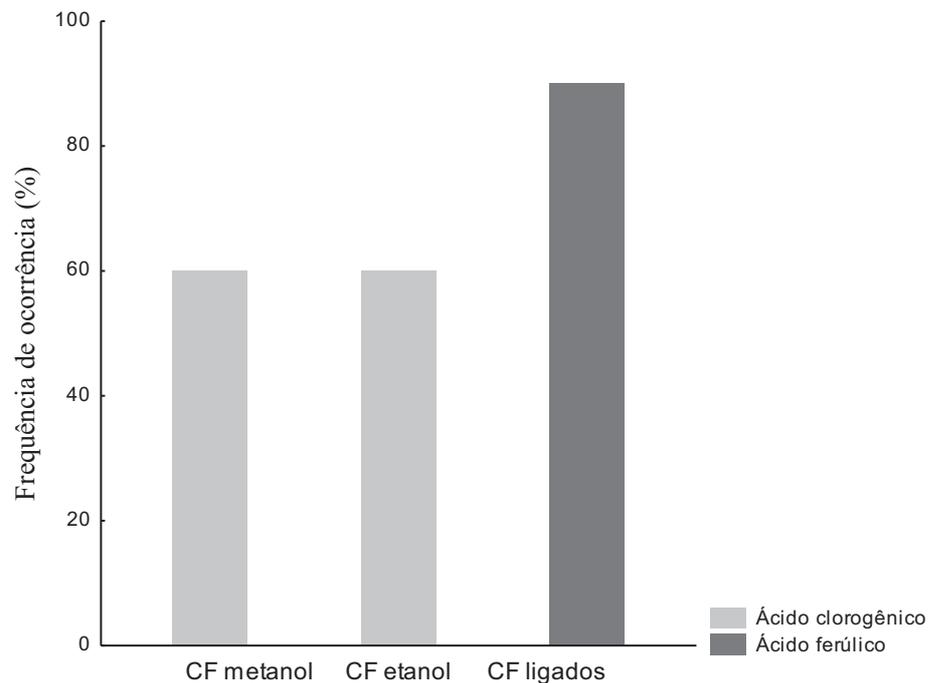
Feijão	AF livres (%)	AF conjugados (%)	AF ligados (%)
Preto	Cafeico (28,7)	Clorogênico (58,3)	Ferúlico (52,6)
Carioca	Clorogênico (42,3)	Protocateico (36,3)	Ferúlico (46,7)
Vermelho	Siríngico (61,1)	Protocateico (31,8)	Ferúlico (28,1)
Branco	Clorogênico (14,1)	Clorogênico (77,1)	Ferúlico (60,8)
Chinês	Clorogênico (32,3)	Clorogênico (47,6)	Ferúlico (43,2)
Amendoim	Gálico (26,5)	Gálico (49,8)	Ferúlico (44,9)
Jalo	Clorogênico (38,2)	Clorogênico (37,6)	Ferúlico (38,1)
Rajado	Clorogênico (77,1)	Clorogênico (38,3)	Ferúlico (42,3)
Fradinho	Clorogênico (74,7)	Clorogênico (41,9)	Ferúlico (51,5)
Azuki	Protocateico (45)	Gálico (57)	Cumárico (52,8)

O ácido clorogênico também têm se mostrado um eficiente inibidor da enzima α -amilase, auxiliando na prevenção e terapia de síndromes metabólicas como a diabetes tipo II e também a obesidade através do controle da elevação dos níveis de glicose no plasma sanguíneo pelo retardamento da digestão e absorção de carboidratos (NARITA; INOUE,

2011). O ácido clorogênico presente em grãos, bem como os outros AF, também têm demonstrado inibir a atividade de amilases digestivas de patógenos impedindo o aproveitamento de substrato e evitando a degradação e contaminação dos alimentos (FENG et al., 1996).

Nos extratos contendo os CF ligados, o ácido ferúlico foi o majoritário em 90% dos feijões analisados (Figura 3). Estudos têm demonstrado que este AF pode estar presente em muito cereais, leguminosas e frutas principalmente na forma esterificada com polissacarídeos. O ácido ferúlico também está consagrado para uso industrial e funcional por sua atividade antioxidante, antidiabética e anticâncer que também já comprovadas (KUMAR, PRUTHI, 2014). No entanto, acredita-se que o efeito dos CF solúveis em metanol e etanol seja mais eficiente para estes fins, devido ao fato de se apresentarem livres e não esterificados com compostos da parede celular.

Figura 3 - Percentual de frequência de ácidos fenólicos predominantes nas variedades de feijões.



Luthria e Pastor-Corrales (2006) avaliaram o perfil de compostos fenólicos extraídos a partir de hidrólise alcalina (ligados) de diferentes variedades de feijões e obtiveram o ácido ferúlico como predominante, seguido pelo ácido cumárico e sináptico. Ramírez-Giménez et al (2014) encontraram em feijões preto e marrom um total de 5 ácidos

fenólicos na fração metanólica, onde o ácido gálico e o clorogênico foram os predominantes, seguido pelo ácido cafeico de forma semelhante a este estudo.

Nos extratos de CF livres (solúveis em metanol e etanol 80%), o ácido clorogênico foi o majoritário em 60% dos feijões analisados (Figura 3). O mesmo vem sendo mencionado em vários alimentos e bebidas, como o café, que é uma das bebidas mais consumidas no mundo e importante fonte de ácido clorogênico. Diversas atividades biológicas deste ácido fenólico têm sido reportadas, destacando-se a atividade antioxidante, antimutagênica, supressão de doenças cardiovasculares e redução da incidência de carcinogênese (SHIN et al., 2015).

6.3 Frações proteicas

Diferentes tipos de inibidores podem ser encontrados em cereais e leguminosas com estruturas moleculares e modos de ação variados, mas usualmente são de caráter protéico. Inibidores protéicos de α -amilase tem se mostrado uma importante forma de controle biológico de pragas, tais como, insetos, bactérias e fungos (PAGNUSSATT et al., 2013). Neste trabalho, as diferentes frações proteicas presentes nas amostras de feijão (albumina, globulina, prolamina e glutelina) foram extraídas sequencialmente (Tabela 10) para avaliar, posteriormente, seu potencial como inibidor de amilase fúngica.

A fração proteica presente em maior quantidade foi a albumina que por ser proteína de reserva fica mais disponível para ser solubilizada em água. A composição em proteínas solúveis variou de acordo com a espécie do feijão. O feijão carioca, pertencente à espécie *Phaseolus vulgaris*, foi a leguminosa que apresentou o maior teor de albumina (559 mg.g⁻¹), globulina (164 mg.g⁻¹) e glutelina (325 mg.g⁻¹). Com relação à fração prolamina, o feijão preto (brasileiro e chinês) apresentou o maior teor (64,3 e 65,2 mg.g⁻¹, respectivamente), seguido pelo feijão carioca (54,4 mg.g⁻¹). O feijão fradinho, pertencente à espécie *Vigna unguiculata*, foi o que apresentou os menores teores de todas as frações proteicas (162 mg alb.g⁻¹, 22 mg glob.g⁻¹, 10 mg prol.g⁻¹ e 34 mg glut.g⁻¹).

Tabela 10 - Distribuição das frações albumina, globulina, prolamina e glutelina dos feijões e seus coeficientes de variação.

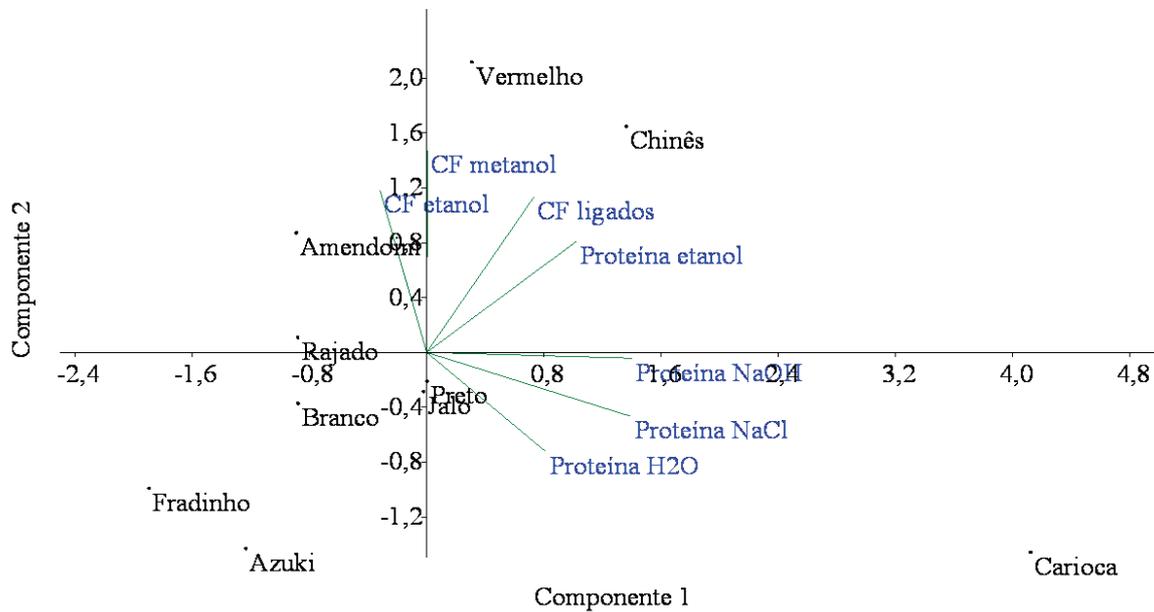
Feijão	Água (mg albu.g ⁻¹)	NaCl (mg glob.g ⁻¹)	Etanol (mg prol.g ⁻¹)	NaOH (mg glut.g ⁻¹)	Total (mg.g ⁻¹)
Preto	295,0 ^{bc} (4,6)	52,3 ^c (4,2)	64,3 ^a (5,2)	59,0 ^{de} (5,2)	470,0 ^{cde} (3,1)
Carioca	559,0 ^a (12,2)	164,0 ^a (0,2)	54,4 ^b (13,8)	325,0 ^a (7,6)	1109,5 ^a (7,0)
Vermelho	242,8 ^{cde} (1,3)	47,2 ^c (4,1)	40,8 ^c (1,1)	99,2 ^c (7,0)	430,0 ^{def} (1,3)
Branco	511,8 ^a (6,1)	43,2 ^c (2,2)	20,5 ^{ef} (6,9)	41,5 ^{de} (8,1)	622,8 ^b (5,0)
Chines	170,4 ^e (5,2)	66,7 ^b (5,6)	65,2 ^a (3,1)	221,5 ^b (4,2)	515,0 ^{cd} (3,4)
Amendoim	260,5 ^{cd} (14,1)	47,0 ^c (2,2)	37,6 ^c (5,5)	51,3 ^{de} (10,0)	400,4 ^{ef} (10,0)
Jalo	357,4 ^b (12,4)	51,6 ^c (14)	34,7 ^{cd} (11,0)	125,1 ^c (5,6)	570,0 ^{bc} (9,4)
Rajado	212,7 ^{cde} (5,0)	26,2 ^e (0,01)	29,1 ^{de} (0,01)	63,2 ^d (4,0)	336,2 ^{fg} (3,6)
Fradinho	162,3 ^e (9,4)	22,0 ^e (14,7)	10,2 ^g (5,9)	33,9 ^e (14,3)	228,5 ^h (7,6)
Azuki	181,0 ^{de} (9,5)	36,0 ^d (3,8)	18,8 ^{fg} (3,7)	54,1 ^{de} (8,3)	287,0 ^{gh} (7,5)

Resultados expressos com média e coeficiente de variação (CV%). Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$.

Naozuka e Oliveira (2012) realizaram a extração sequencial das proteínas do feijão e obtiveram teores de 2,84 mg.g⁻¹, 3,50 mg.g⁻¹, 0,54 mg.g⁻¹ e 9,3 mg.g⁻¹ para a fração albumina, globulina, prolamina e glutelina, respectivamente. Alguns fatores bióticos e abióticos além daqueles referentes ao procedimento de extração e quantificação das proteínas podem ter causado esta diferença. Os autores utilizaram a proporção de 5 gramas de amostra para 10 mL de solvente extrator, o que pode ter causado a saturação do solvente e por consequência disto a subestimação do conteúdo. Com relação à quantificação das proteínas solúveis, foi utilizado o método Bradford, o qual avalia a concentração protéica por um princípio diferente do método de Lowry usado neste estudo.

6.4 Análise Multivariada

A ACP (Figura 4) permite verificar qual a influência de cada componente sobre cada variável, sendo que esta é diretamente proporcional a sua proximidade ao eixo dos componentes e é determinada pelo valor de correlação de Pierson (R) (Tabela 11). Quanto maior este valor, em módulo, maior a relação entre a variável e o componente avaliado.

Figura 4 – ACP dos inibidores fenólicos e proteicos dos feijões.**Tabela 11** - Variância explicada e correlação (R) das variáveis (compostos fenólicos e proteínas solúveis) dos componentes.

Componente	Variância (%)	Correlação (R)						
		CF metanol	CF etanol	CF ligados	Prot. H ₂ O	Prot. NaCl	Prot. Etanol	Prot. NaOH
1	41,9	0,0048	-0,218	0,502	0,5572	0,954	0,703	0,9595
2	21,2	0,7186	0,5771	0,552	-0,353	-0,227	0,396	-0,0207

De acordo com a Figura 4 e com o valor R descrito na Tabela 11, as proteínas são altamente influenciados pela componente 1, sendo esta responsável pela explicação de 42 % da variabilidade dos resultados. Os compostos fenólicos (solúveis em etanol, metanol e ligados), por sua vez, são mais explicadas pela componente 2.

Através da ACP é possível observar claramente que os compostos fenólicos e as proteínas podem apresentar mecanismos diferentes para atuar como inibidores de α -amilase, tendo em vista que cada grupo de variáveis é melhor explicado por diferentes componentes, o que reforça a idéia deste trabalho em testar o potencial inibidor de ambos os grupos de variáveis.

A fração de CF conjugados (solúveis em metanol 80%) foi escolhida para realização do teste de inibição enzimática, pois apresentou maior teor de ácidos fenólicos do que a fração de CF livres e ligados. A fração proteica de prolaminas (solúveis em etanol

70%), por sua vez, foi escolhida com base em relatos científicos (PAGNUSSATT et al., 2012) que demonstram que este é o solvente mais adequado para a extração de proteínas inibidoras de amilase. Além disso, a utilização destes constituintes em etanol permite comparar a eficiência dos CF e PS em um mesmo solvente.

Os extratos de CF conjugados do feijão amendoim e azuki e os extratos de prolaminas do feijão carioca e fradinho foram escolhidos para realização do teste de inibição enzimática, a fim de verificar a diferença que extratos com maiores (feijão amendoim e carioca) e o menores (azuki e fradinho) teores de compostos fenólicos e proteínas solúveis apresentam com relação ao potencial para inibir a atividade de α -amilase fúngica comercial.

6.5 Teste de inibição enzimática

A quantificação do efeito inibidor da amilase fúngica dos extratos escolhidos foi estimada com a enzima produzida por *Aspergillus oryzae* cuja atividade específica era de 4,8 mg amido hidrolisado.mg proteína⁻¹.mL⁻¹. Foram utilizados os extratos de inibidores fenólicos e proteicos escolhidos pela ACP em 3 níveis de concentração (Tabela 12).

Maiores teores de inibição enzimática foram observados, para o feijão fradinho, azuki e carioca, à medida que a alíquota de extrato inibidor foi aumentada no meio reacional. O mesmo não foi observado para o feijão amendoim, onde houve redução significativa do percentual de inibição com o aumento da alíquota de extrato inibidor.

Tabela 12 - Percentual (%) de inibição enzimática dos extratos proteicos (feijão carioca e fradinho) e fenólicos (feijão azuki e amendoim) sobre a enzima α -amilase.

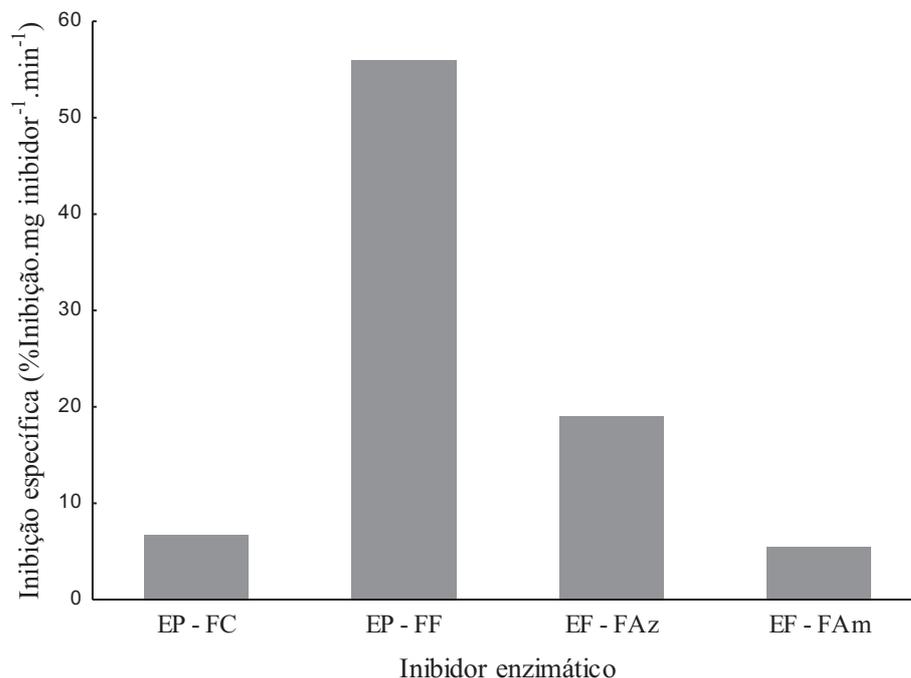
Volume de extrato (mL)	Inibidor proteico		Inibidor fenólico	
	Feijão carioca	Feijão fradinho	Feijão Azuki	Feijão Amendoim
0,5	11 (2,8) ^c	13,4 (3,5) ^c	15,1 (1,7) ^a	26 (5,9) ^c
1	22,2 (6,6) ^b	29 (6,5) ^b	26,5 (6,4) ^a	24,2 (1,5) ^b
1,5	26,6 (6,4) ^a	37 (4,7) ^a	33,3 (7,4) ^b	17,2 (1,7) ^a

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$.

Os extratos dos feijões fradinho e azuki apresentaram os menores teores de inibidores (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 46 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente) quando comparados aos extratos dos feijões carioca e amendoim (102 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 181 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). No entanto, apresentaram os maiores percentuais de inibição enzimática. A partir desta observação, é possível afirmar que os extratos de inibidores de feijões pertencentes à espécie *Phaseolus*

vulgaris (carioca e amendoim), apresentam menor especificidade para inibir a enzima do que os extratos das espécies *Vigna unguiculata* (fradinho) e *Vigna angularis* (azuki). Este resultado é confirmado pela Figura 5, que apresenta a capacidade de inibição dos extratos sobre a enzima, expressos como inibição específica.

Figura 5 – Inibição específica dos inibidores proteicos e fenólicos. Sendo EP-FC: extrato proteico do feijão carioca; EP-FF: extrato proteico do feijão fradinho; EF-FAz: extrato fenólico do feijão azuki; EF-FAm: extrato fenólico do feijão amendoim.



O extrato proteico da espécie *Vigna unguiculata* (feijão fradinho) apresentou a maior eficiência no processo de inibição enzimática específica (56% inibição.mg inibidor⁻¹.min⁻¹). Este resultado pode estar relacionado com a sua sequência de aminoácidos e consequente estrutura molecular. Um tipo de proteínas em especial, as lectinas, podem ter sido extraídas nesta fração e contribuído para este efeito. Elas têm sido purificadas e caracterizadas a partir de diferentes variedades de feijões e possuem a capacidade de manter ligações reversíveis com carboidratos e substâncias que contém açúcares. A isoforma melhor caracterizada é conhecida como α -AI1 e foi identificada como um inibidor de α -amilase homólogo à fito-hemaglutinina (PHA). A segunda variante da α -amilase chamada α -AI2 pode ser encontrada em alguns tipos de feijão selvagens (FRANCO et al, 2002). Estas duas isoformas de inibidores apresentam diferentes especificidades com relação à enzima α -

amilase, mas este aspecto não foi explorado neste estudo. Polipeptídios de α -AI1 de cultivares de feijoeiro comum, encontrados na Hungria, foram purificados e caracterizados e foram detectadas diferenças que podem refletir na atividade inibitória dos cultivares (MACZÓ et al., 2014).

Com relação aos inibidores fenólicos, compostos foram extraídos de diferentes cultivares de feijões provenientes do México e do Brasil e o seu potencial como inibidor de α -amilase foi testado. A inibição variou de 26% (cultivar brasileiro) à 74% (cultivar mexicano), sendo que todos foram extraídos com metanol sob as mesmas condições (24 h à 20°C) (MOJICA et al., 2014).

Os extratos proteicos e fenólicos dos feijões foram extraídos com o mesmo solvente (etanol), que diferiu pouco com relação à concentração (70% para as proteínas e 80% para os fenóis). Por este motivo, é possível que possa ter ocorrido a extração simultânea de ambos inibidores em cada fração. Sendo assim, uma alíquota do extrato dos inibidores proteicos do feijão carioca e fradinho foi seca sob atmosfera de nitrogênio e levada para quantificação e identificação de CF em HPLC-UV.

No extrato proteico do feijão carioca foram encontrados os AF vanilina ($1,70 \mu\text{g.g}^{-1}$), que foi extraído em maior quantidade do que pelo método convencional de CF ($0,12 \mu\text{g.g}^{-1}$) e siríngico ($2,28 \mu\text{g.g}^{-1}$), o qual não foi detectado nos extratos de CF. No extrato proteico do feijão fradinho, além dos AF vanilina ($0,55 \mu\text{g.g}^{-1}$) e siríngico ($0,22 \mu\text{g.g}^{-1}$) também foi encontrado o ácido cumárico ($0,21 \mu\text{g.g}^{-1}$). O AF siríngico não foi extraído pelo método convencional de CF no feijão fradinho, no entanto, os ácidos vanilina e cumárico foram extraídos em maiores quantidades ($0,73 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $6,72 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente).

Portanto é possível que a extração simultânea de ambos inibidores em um mesmo extrato também tenha contribuído com o maior efeito inibidor verificado nos extratos proteicos, principalmente no caso do feijão fradinho.

Para verificar o tipo de inibição enzimática promovido pelos extratos de CF e proteicos dos feijões, a reação enzimática foi efetuada na ausência e na presença de diferentes alíquotas dos inibidores enzimáticos (0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL) e foi realizada a linearização da equação de Michaelis-Menten e construção do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (APÊNDICE 1). A partir da equação da reta gerada foi possível estimar os valores de K_M e $V_{MÁX}$ na ausência e presença dos extratos (Tabelas 13, 14, 15 e 16).

Tabela 13 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato fenólico do feijão azuki.

Reação	K_M	$V_{MÁX}^*$
Sem inibidor	603	20
23 μg inibidor	112	3,6
46 μg inibidor	104,1	3,4
69 μg inibidor	584	18

$V_{MÁX}$ = mg de amido hidrolisado.min⁻¹

Os parâmetros cinéticos avaliados para os extratos fenólicos (feijão azuki e amendoim) (Tabelas 13 e 14) indicam uma inibição enzimática do tipo incompetitiva, onde o valor de K_M e $V_{MÁX}$ diminuíram. Neste tipo de reação, o inibidor se liga ao complexo enzima-substrato originando um complexo inativo e não ocorre a liberação de produto gerado pela ação da enzima.

Tabela 14 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato fenólico do feijão amendoim.

Reação	K_M	$V_{MÁX}^*$
Sem inibidor	603	20
90 μg inibidor	68	2,2
181 μg inibidor	110	3,6
271 μg inibidor	190	6,2

$V_{MÁX}$ = mg de amido hidrolisado.min⁻¹

Com relação aos inibidores proteicos é possível observar (Tabelas 15 e 16) que os parâmetros cinéticos avaliados (K_M e $V_{MÁX}$) aumentaram na reação com a concentração intermediária de inibidor e reduziram na reação com a máxima concentração de inibidor, não seguindo um tipo de inibição que possa ser descrito pelo modelo de Michaelis-Menten.

A análise cromatográfica dos extratos proteicos dos feijões carioca e fradinho quanto a presença de AF permite concluir que o solvente usado para extrair proteína extraiu também alguns AF, o que, provavelmente, justifica o fato dos extratos proteicos não apresentarem uma inibição típica e sim uma inibição decorrente da ação sinérgica entre AF e proteínas.

Tabela 15 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato proteico do feijão carioca.

Reação	K_M	$V_{MÁX}^*$
Sem inibidor	207	6,9
51 μg inibidor	117	3,8
102 μg inibidor	382	12,3
153 μg inibidor	294	9,5

$V_{MÁX}$ = mg de amido hidrolisado.min⁻¹

Tabela 16 - K_M e $V_{MÁX}$ da reação enzimática na ausência e na presença do extrato proteico do feijão fradinho.

Reação	K_M	$V_{MÁX}^*$
Sem inibidor	603	20
8 μg inibidor	107	3,5
16 μg inibidor	422	13,6
24 μg inibidor	153	4,9

$V_{MÁX}$ = mg de amido hidrolisado.min⁻¹

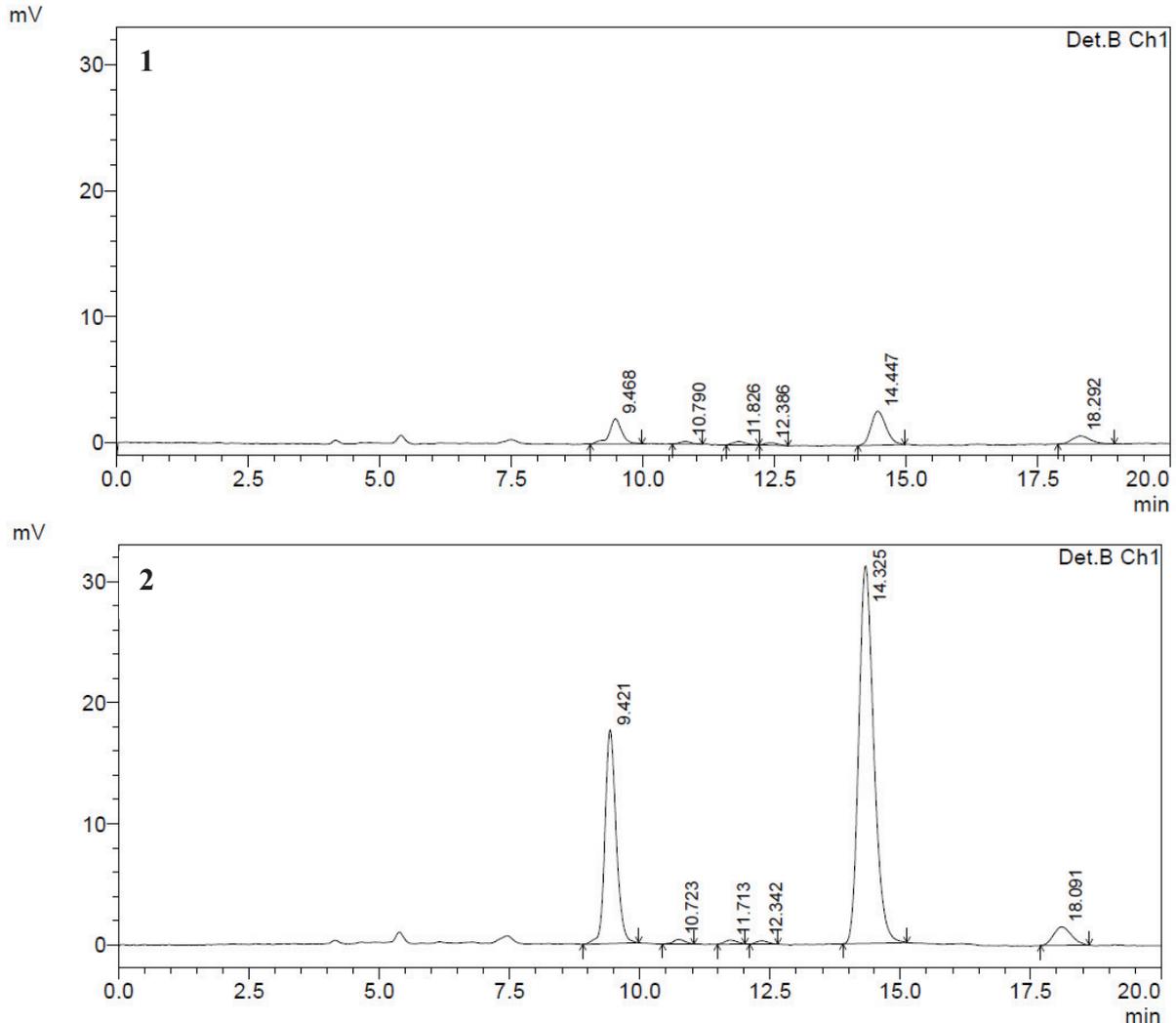
6.6 Determinação de AFLAs

6.6.1 Condições cromatográficas para separação das AFLAs

As condições cromatográficas utilizadas em HPLC-FL permitiram a separação das micotoxinas resultando em tempos de retenção de 9,4; 14,3 e 18 minutos para as AFLAs G_2 , B_2 e B_1 , respectivamente, em tempo total de corrida de 20 min.

Com relação à AFLA G_1 , alguns problemas foram encontrados e a validação da mesma não pôde ser realizada. Na Figura 6 estão apresentados os cromatogramas referentes ao segundo e ao quinto ponto da curva analítica das AFLAs B_1 , B_2 , G_1 e G_2 . As AFLAs G_2 , B_2 e B_1 foram separadas adequadamente, de forma que não houve o alargamento das bandas cromatográficas. A AFLA G_1 , por sua vez, foi dividida em três picos com tempos de retenção distintos e não houve aumento linear da área dos picos com o aumento da concentração do padrão. Em vista da verificação deste efeito durante a separação desta micotoxina optou-se por não determinar AFLA G_1 neste trabalho.

Figura 6 – Cromatogramas das AFLAs B₁, B₂, G₁ e G₂ obtidos através de HPLC-FL. Sendo **1**: Segundo ponto da curva (concentrações de 8,0 ng.mL⁻¹ para as AFLAs B₁ e G₁ e 0,5 ng.mL⁻¹ para as AFLAs B₂ e G₂) ; **2**: quinto ponto da curva (concentrações de 15,0 ng.mL⁻¹ para as AFLAs B₁ e G₁ e 5 ng.mL⁻¹ para as AFLAs B₂ e G₂).



6.6.2 Validação do método analítico para determinação de aflatoxinas

Para assegurar a confiabilidade da determinação de AFLAS em feijão foi realizado o procedimento de validação do método analítico empregado, cujos indicativos analíticos avaliados estão na Tabela 17.

Os indicativos analíticos obtidos foram considerados adequados para a quantificação das três micotoxinas, uma vez que cumprem as recomendações de confiabilidade estabelecidas convencionalmente pelo INMETRO (2003), que inclui a característica de apresentar um coeficiente de correlação acima de 0,90.

Tabela 17 - Parâmetros analíticos avaliados em HPLC-FL.

	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G2
Equação da curva	$y = 2322,9x - 3930,8$	$y = 79530x + 17309$	$y = 40204x + 13860$
Linearidade (ng.mL)	4 - 20	0,1 - 10	0,1 - 10
Coefficiente de correlação	0,9889	0,9979	0,9991
Coefficiente de determinação	0,9781	0,9958	0,9983
LD_i (ng.mL ⁻¹)	2	0,03	0,05
LQ_i (ng.mL ¹)	4	0,1	0,1
LD_m (µg.kg ⁻¹)	2,4	0,036	0,06
LQ_m (µg.kg ⁻¹)	4,8	0,12	0,12

Onde: LD_i = limite de detecção do HPLC-FL; LQ_i = limite de quantificação do HPLC-FL; LD_m = Limite de detecção do método; LQ_m = limite de quantificação do método.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados por meio da comparação dos sinais gerados por concentrações decrescentes do analito com os sinais gerados pelo branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pôde ser detectado. Prietto (2014) validou o método de Rodrigues e Soares-Amaya para a determinação de AFLAs em arroz utilizando HPLC-FL e obtiveram para a AFLA B₁ resultados de 0,4 ng.mL⁻¹ e 1,2 ng.mL⁻¹ de LD e LQ do instrumento, respectivamente. Para as AFLAs B₂ e G₂ obtiveram valores de 0,1 ng.mL⁻¹ e 0,3 ng.mL⁻¹, respectivamente. Com relação aos LD e LQ do método, os autores determinaram valores de 0,1 µg.kg⁻¹ e 0,3 µg.kg⁻¹, respectivamente, para a AFLA B₁ e valores de 0,02 µg.kg⁻¹ e 0,07 µg.kg⁻¹ para as AFLAs B₂ e G₂.

Os percentuais de recuperação das micotoxinas foram determinados para três variedades de feijão (Tabela 18) que foram escolhidas em função da característica que as distingue, a cor. Sendo assim, foram determinadas a recuperação de um feijão da classe branca (feijão branco), classe preta (feijão preto) e classe cores (feijão carioca).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos traço geralmente estão entre 70 e 120 %, com precisão de até ± 20 %. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120 %, com precisão de até 15 % (Sanco, 2007; Ribani et al. 2004). As recuperações diferiram nos níveis de concentrações avaliados, pois ocorre uma perda da eficiência quando é necessário recuperar AFLAs que apresentam maior ou menor afinidade com o solvente de extração, neste caso prioriza-se o extrator que propicia a determinação simultânea dos analitos.

Tabela 18 - Percentual de recuperação das micotoxinas para os feijões branco, preto e carioca e os coeficientes de variação.

AFLA	Feijão branco		
	1º Nível (CV)	2º Nível (CV)	3º Nível (CV)
B ₁	60 (11,3)	73,5 (4,0)	115,1 (9,2)
B ₂	65,1 (17,9)	82,8 (4,3)	86 (7,0)
G ₂	73,4 (17,3)	120,4 (2,4)	81 (2,6)
AFLA	Feijão preto		
	1º Nível (CV)	2º Nível (CV)	3º Nível (CV)
B ₁	76 (23)	68 (5,2)	83 (15,4)
B ₂	49 (9,1)	118 (0,3)	63 (1,1)
G ₂	82 (4,4)	50 (4,0)	100 (1,6)
AFLA	Feijão carioca		
	1º Nível (CV)	2º Nível (CV)	3º Nível (CV)
B ₁	75 (17,5)	76 (16,2)	75 (24,3)
B ₂	51 (16,6)	55 (6,3)	121 (3,0)
G ₂	72 (19,3)	77 (5,2)	98 (4,7)

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Para AFLA B₁: 1º nível= 14,5 µg.kg⁻¹; 2º nível= 18 µg.kg⁻¹ e 3º nível= 24 µg.kg⁻¹. Para as AFLAs B₂ e G₂: 1º nível= 3 µg.kg⁻¹; 2º nível= 6 µg.kg⁻¹ e 3º nível= 12 µg.kg⁻¹.

Os feijões com pigmentação escura apresentaram níveis de recuperação mais adequados para os padrões de confiabilidade quando os níveis de AFLAs eram mais elevados, e no feijão carioca verificou-se a maior variabilidade nas determinações realizadas.

Tendo em vista que a recuperação das AFLAs foi considerada aceitável para os feijões branco, preto e carioca, e que os demais feijões analisados fazem parte destas classes de cores, considerou-se que a recuperação nas demais amostras, se comporta de maneira similar.

6.7 Ocorrência das AFLAs B₁, B₂ e G₂ em amostras de feijão

Amostras de 10 tipos de feijão foram analisadas quanto à sua contaminação natural por AFLAB₁, AFLAB₂ e AFLAG₂ utilizando o método de extração segundo Soares e Rodriguez-Amaya (1989) adaptado e a quantificação por HPLC-FL.

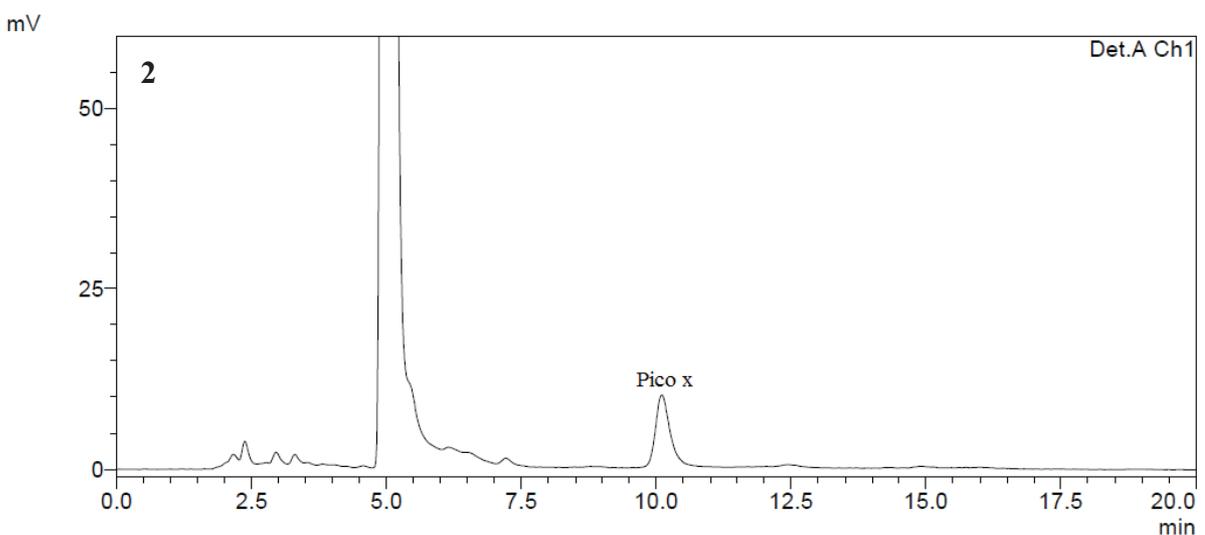
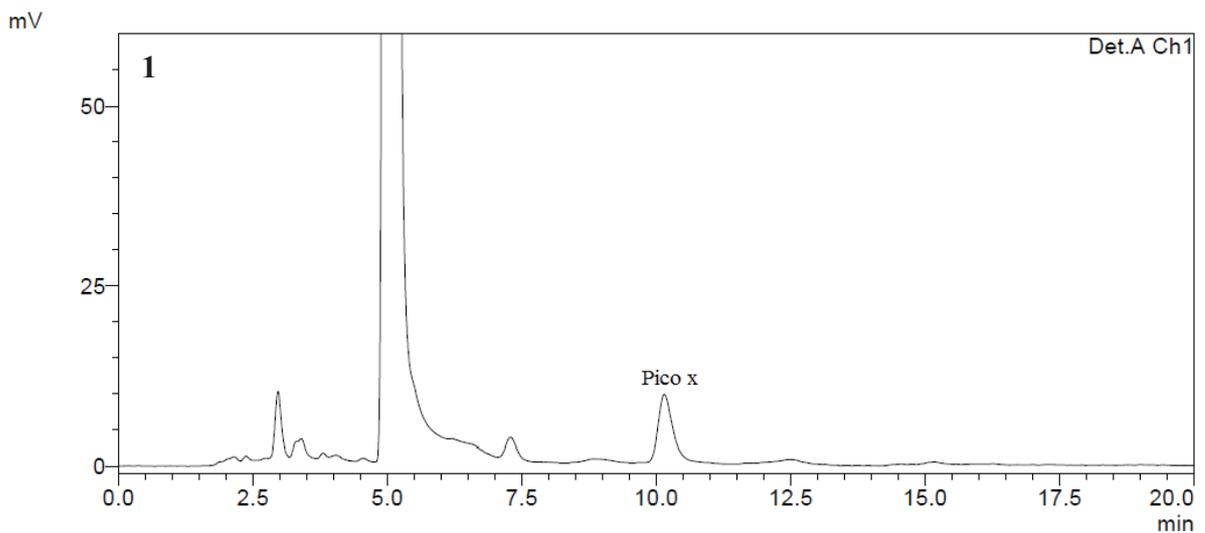
As 10 amostras de feijão analisadas não apresentaram contaminação com nenhuma AFLA validada pelo estudo. Relatos na literatura sobre a incidência de AFLAs em feijão ainda são escassos, tendo em vista que poucos países apresentam legislação específica

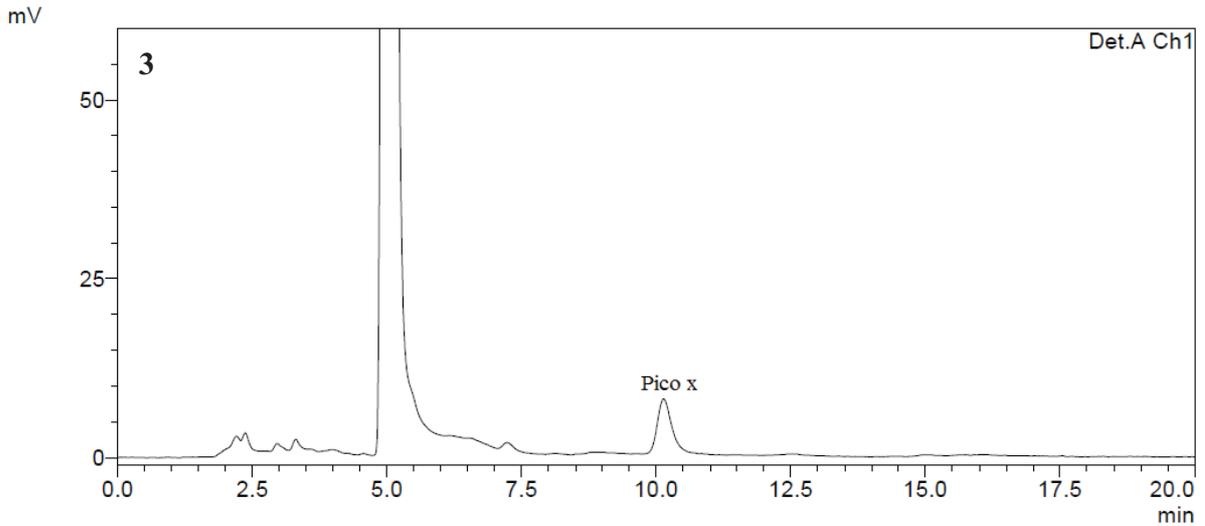
para AFLAs em feijão (Suriname, Guatemala, Macedônia, Sérvia e China) e que o mesmo foi incluído na legislação brasileira recentemente, em 2011 (ANVISA, 2011).

No cromatograma de eluição do extrato de AFLAs dos 10 diferentes feijões analisados foi observada a presença de um pico com tempo de eluição de aproximadamente 10 min. O mesmo pico pôde ser observado nos extratos de AFLAs do feijão branco, preto e carioca (Figura 7). Para confirmar a determinação realizada ou se tal pico poderia mascarar a determinação de AFLAG₂ ou AFLAG₁, os padrões de AFLAs e os extratos dos feijões foram submetidos a cromatografia líquida com fonte de ionização por eletro spray acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS).

Figura 7 - Cromatogramas de eluição do extrato de aflatoxinas obtidos através de HPLC-FL.

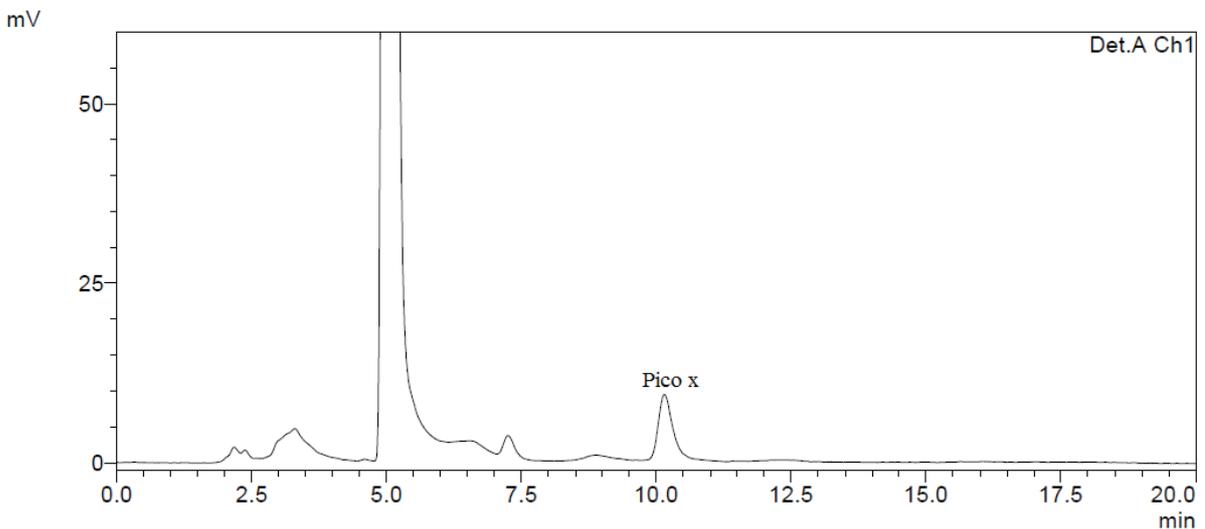
Sendo **1**: Extrato do feijão branco; **2**: Extrato do feijão preto; **3**: extrato do feijão carioca.





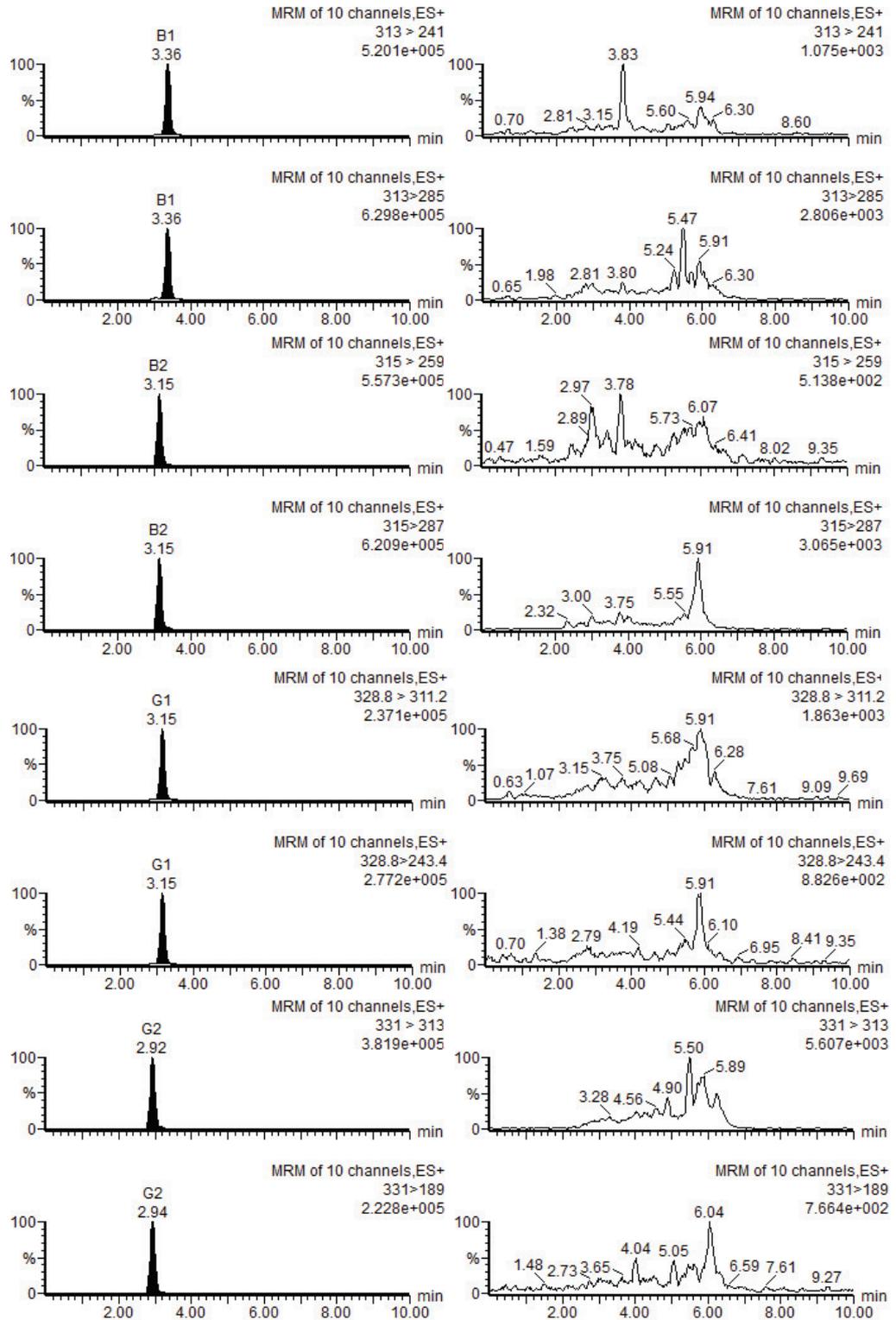
Na Figura 8 está apresentado o cromatograma de eluição do extrato de AFLAs do feijão vermelho. O mesmo extrato foi levado para quantificação em detector de massas (Figura 9), no qual o limite de detecção era de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ para as AFLAs B₁, B₂, G₁ e G₂ e o limite de quantificação foi de $0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ para as AFLAs B₁, B₂, G₁ e G₂.

Figura 8 - Cromatograma de eluição do extrato de AFLAs do feijão vermelho obtidos através de HPLC-FL.



Ao comparar os cromatogramas dos padrões de AFLAs com o extrato da amostra (Figura 9) é possível verificar que não houve a formação de nenhum íon característico das AFLAs B₁, B₂, G₁ e G₂. Este resultado indica que o pico característico que elui nos extratos dos feijões das 10 diferentes variedades não é nenhuma das micotoxinas em estudo.

Figura 9 – Cromatogramas de eluição dos padrões de AFLAs e do extrato de AFLAs do feijão vermelho em LC-ESI-MS/MS. Onde: Lado esquerdo representa os padrões de AFLAS (1 mg.L^{-1}) e as duas transições de cada composto; Lado direito representa o extrato da amostra.



6.8 Composição química e a ocorrência de AFLAs em feijões

San e Chan (1987) avaliaram o efeito de compostos fenólicos na inibição do metabolismo de AFLA B₁, incubando a mesma durante 20 minutos à 37°C com uma mistura de CF. Para reproduzir o metabolismo da AFLA B₁ também foi adicionado nessa mistura um composto de microsomas e enzimas (S9) do fígado. Ao longo do período de incubação, através de análise cromatográfica, foi observada a formação de picos atípicos, os quais aumentaram de tamanho com o aumento do tempo de incubação indicando que houve a formação de metabólitos fluorescentes da AFLA B₁. Os autores não identificaram os picos atípicos que se formaram em função da presença dos CF. O mesmo pode ter ocorrido nas condições naturais dos feijões deste levantamento, ou seja, formação de AFLAs derivadas.

Há relatos de que as plantas podem reduzir a toxicidade das micotoxinas através de modificações químicas ou por inclusão das mesmas na matriz da planta. Estes processos de detoxificação podem incluir a conjugação das micotoxinas à substâncias polares como açúcares e aminoácidos e consequente armazenamento destes derivados nos vacúolos. Até agora, as micotoxinas mascaradas que foram estudadas com detalhes são produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, como o desoxinivalenol, zearalenona e fumonisinas (BERTHILLER et al., 2005), mas as AFLAs também constituem problema para as células vegetais, portanto, mecanismos de detoxificação podem estar envolvidos no sistema de proteção.

Outros constituintes dos feijões como as vitaminas do complexo B, podem estar sendo extraídos durante a preparação da amostra para determinação das AFLAs e detectados pelo detector de fluorescência tendo em vista que alguns membros desta família apresentam esta característica. Grãos de feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* apresentaram teores de vitaminas B₁, B₂ e B₆ em torno de 0,065; 0,103; 0,193 mg/100 g, respectivamente (SÁNCHEZ-MATA; CÁMARA; DÍEZ-MÁRQUÉS, 2003) e a polaridade delas deixa dúvidas sobre a sua afinidade com os extratos utilizados.

A presença de AFLAs foi determinada em alguns alimentos coletados simultânea e diretamente em residências de voluntários na cidade de Pirassununga, localizada no interior de São Paulo, Brasil. Foram avaliadas amostras de feijões que apresentaram incidência de AFLAs em baixos níveis (0,025 – 0,42 µg.kg⁻¹), abaixo do limite da legislação brasileira (5 µg.kg⁻¹) (JAGER et al., 2013).

Outro estudo avaliou a ocorrência de fungos toxigênicos e AFLAs em alguns alimentos provenientes de países da Ásia e comercializados na Escócia. Fungos do gênero

Aspergillus spp. foram encontrados em amostras de feijão preto, no entanto não foram detectadas AFLAs reforçando a idéia de que a presença de fungos não implica, obrigatoriamente na produção de micotoxinas (RUADREW; CRAFT; AIDOO, 2013).

Um fator importante que pode ter contribuído com estes resultados está relacionado com a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Pesquisas tem sido realizadas para demonstrar que a biossíntese das AFLAs ocorre como resposta do fungo ao estresse oxidativo, resultado da exposição ou produção de espécies reativas de oxigênio tóxicas, como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, e que compostos naturais como os CF podem atenuar a citotoxicidade destas espécies.

Kim e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antioxidante de CF associados com a inibição da biossíntese de AFLAs. O ácido cafeico foi incubado com esporos de *Aspergillus flavus* e foi verificado que a produção de AFLAs em placas tratadas com o ácido fenólico reduziu 95% quando comparada com placas controle. No entanto, a massa fúngica foi semelhante nos dois tratamentos indicando que o ácido cafeico é um potente agente antimicotoxigênico que não apresentou efeito significativo para reduzir o crescimento fúngico. Os ácidos clorogênico e gálico também foram testados quanto ao potencial para atenuar o estresse oxidativo de peróxidos orgânicos e demonstraram uma resposta eficaz. No caso deste trabalho, o ácido clorogênico foi encontrado predominantemente em 60% dos feijões.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os feijões apresentam compostos funcionais que estão associados à mecanismos de defesa contra patógenos, como os fungos. Dentre estes compostos estão algumas proteínas e os compostos fenólicos. Ambos demonstraram inibir a atividade de uma enzima, proveniente da espécie fúngica *Aspergillus oryzae*, que desempenha importante papel na digestão de amido, a α -amilase. Foi demonstrado que uma combinação de diferentes compostos que, provavelmente, atuam em sinergia podem ser encontrados nos feijões e contribuir como uma barreira de defesa contra a produção de AFLAs, o que comprova a hipótese inicial de que os feijões possuem composição que os torna pouco susceptíveis a produção de AFLAs.

A composição química de um substrato é um fator determinante para a contaminação fúngica ou manifestação do potencial toxicológico de algumas espécies. Este fator possivelmente explica a ausência de contaminação com AFLAs nas amostras de feijões estudados. Em caso de contaminação, os riscos de danos à saúde pública poderiam ser estimados a partir de um estudo avaliativo do grau de exposição da população com base na

quantidade de feijão consumido durante um certo período de tempo. Medidas de controle das condições ambientais de umidade e temperatura ambiente, bem como dos métodos de processamento do feijão seriam necessários para prevenção da contaminação fúngica e do dano causado pela produção de micotoxinas.

7 CONCLUSÃO

Os maiores teores de ácidos fenólicos nos feijões estão na fração solúvel em etanol, na qual os ácidos majoritários foram o clorogênico, o gálico e o protocateico. O feijão amendoim se destacou pelo maior teor de ácidos fenólicos livres ($68 \mu\text{g.g}^{-1}$) enquanto o feijão azuki obteve o menor teor ($28 \mu\text{g.g}^{-1}$).

O feijão carioca e preto, pertencentes à espécie *Phaseolus vulgaris*, apresentaram os maiores teores de albumina, globulina, prolamina e glutelina. O feijão fradinho, da espécie *Vigna unguiculata*, apresentou os menores teores de todas as frações proteicas.

Os extratos dos feijões fradinho e azuki, pertencentes às espécies que apresentaram os menores teores de proteína solúvel e compostos fenólicos, apresentaram os maiores percentuais de inibição específica (56 e 20% inibição.mg inibidor⁻¹.min⁻¹), respectivamente). O tipo de inibição enzimática promovida pelos extratos fenólicos foi a incompetitiva e os extratos proteicos não seguiram o modelo de inibição definido pelo sistema Michaeliano.

O método cromatográfico validado para determinação de AFLAs cumpriu as exigências de confiabilidade apresentando coeficiente de correlação acima de 0,98 com valores de LD_m de 2,4; 0,036 e 0,06 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para as AFLAs B₁, B₂ e G₂, respectivamente e LQ_m de 4,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFLA B₁) e 0,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFLAs B₂ e G₂).

Não foram detectadas AFLAs B₁, B₂ e G₂ nos feijões das espécies *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* e *Vigna angularis* coletados pelo estudo no comércio na região sul do RS.

Os extratos protéicos e fenólicos dos feijões analisados inibiram a atividade da amilase fúngica de *Aspergillus oryzae*, portanto estes são potencialmente capazes de constituírem mecanismo de defesa ao ataque fúngico e/ou inibição da produção de AFLAs.

8 REFERÊNCIAS

- ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**. v, 107, p. 449-455, 2006.
- ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C.; et al. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.1, n.1, p.12-18, 1995.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.
- APARICIO-FERNÁNDEZ, X., MANZO-BONILLA, L., LOARCA-PIÑA, G. F. Comparison of Antimutagenic Activity of Phenolic Compounds in Newly Harvested and Stored Common Beans *Phaseolus vulgaris* against Aflatoxin B₁. **Sensory and Nutritive Qualities of Food**. v. 70, p. 73-78, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC**: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.
- BARAMPAMA, Z., SIMARD, R. E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. **Food Chemistry**. v. 47, p. 159-167, 1993.
- BARAJ-ACEVES, M.; HASSAN, M.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**. v. 50, p. 227– 236, 2002.
- BERI, V.; GRUPTA, R. Acetylcholinesterase inhibitors neostigmine and physostigmine inhibit induction of alpha-amylase activity during seed germination in barley, *Hordeum vulgare* var. Jyoti. **Life Sciences**, v.80, p. 2386-2388, 2007.
- BERTHILLER, F.; ASTRA, C. D.; SCHUHMACHER, R.; LEMMENS, M. ADAM, G.; KRŠKA, R. Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 3421-3425, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-WissenschaftTechnologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Resolução Nº 7. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Ministério da Saúde – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 18 de fevereiro de 2011.
- BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Food Reviews International**, v. 9, p. 237-297, 1993.

BRESSANI, R.; ELÍAS, L. G.; BRAHAM, J. E. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. **Journal of Plant Foods**, v. 4, p. 43-55, 1982.

CAMPBELL, M. K., FARREL, S. O. **Bioquímica**. 5ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2007.

CARVALHO, M. L. M.; VON PINHO, E. V. R. **Armazenamento de sementes**. 1997. 67 f. Monografia (Especialização à Distância em Produção e Tecnologia de Sementes) - Lavras: UFLA/FAEPE, 1997.

CHIARADIA, M. C.; COLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento – **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/busca.php?filtro=prospec%E7%E3o%20de%20mercado>. Acesso em: 25 set. 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento – **Estudos de prospecção de mercado**. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_10_16_05_53_boletim_portugues_setembro_2013.pdf. Acesso em: 24 set. 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento – **Perspectivas para a agropecuária. Perspec. agropec.** v.2, p. 1-155, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento – **Acompanhamento da safra brasileira. Acomp. safra bras. Grãos.** v.2, p. 1-90, 2015.

COSTA, L. L. F.; SCUSSEL, V. M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus Vulgaris L.*) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 138-144, 2002.

D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**. v. 69, p. 155-166, 1997.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24, p. 401- 449, 1987.

DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 139-145, 1985.

DING, X.; LI, P.; BAI, Y.; ZHOU, H. Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. **Food Control**. v. 23, p. 143-148, 2012.

DG-SANCO. EUROPEAN COMMISSION. Method Validation and Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. 2007. **Document No. SANCO/2007/3131**. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf Acesso em: 21 dez. 2015.

DOMIJAN, A. M.; PERAICA, M.; LENDER, V. Z.; CVJETKOVIC, B.; JURJEVIC, Z.; TOPOLOVEC-PINTARIC, S.; IVIC, D. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, p. 427-432, 2005.

DORS, G. C., CALDAS, S. S., FEDDERN, V., HEIDTMANN-BEMVENUTI, R., HACKBART, H. C. S., SOUZA, M. M., OLIVEIRA, M. S., GARDA-BUFFON, J., PRIMEL, E. G., BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxins: Contamination, Analysis and Control, Aflatoxins. **Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology**. Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.) USA, 2011

EMBRAPA. Cultivo de feijão-caupi. Embrapa meio-norte. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

FAO statistics. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 15 set. 2013.

FENG, G.; RICHARDSON, M.; CHEN, M.; KRAMER, K.J.; MORGAN, T.D.; REECK, G.R. α -amylase inhibitors from wheat: amino acids sequence and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 419-426, 1996.

FIGUEIRA, E. L. Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A. C.; ONO, E. Y. S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. New Amylase Inhibitor Present in Corn Seeds Active In Vitro Against Amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**. v. 87, n. 3, p. 233-240, 2002.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **As micotoxinas**. Revista-fi. n. 7, 2009. Disponível em: www.revist-fi.com. Acesso em: 15 set, 2013.

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI DE SA, M.F.. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insects α -amylases. **European Journal of Biochemistry**. v. 269, p. 397-412, 2002.

FUNK, A.; WEDER, J. K. P.; BELITZ, H. D. Primary structures of proteinase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* var. nanus (cv. Borlotto). **Zeitschrift fuer lebensmitte Untersuchung und Forschung**. v. 196, p. 343-350, 1993

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

GENOVESE, M. I. **Digestibilidade e biodisponibilidade de metionina de frações protéicas do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 115 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

GEPTS, P.; BEAVIS, W. D.; BRUMMER, E. C.; SHOEMAKER, R. C.; STALKER, H. T.; WEEDEN, N. F.; YOUNG, N. D. Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and

Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. **Plant Physiology**. v. 137, p. 1228-1235, 2005.

GIORNI, P.; MAGAN, N.; BATTILANI, P. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 213 – 218, 2009.
GRAHAM, P., VANCE, C. P. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. **Plant Physiology**. v. 131, p. 872-877, 2003.

GROSSI DE SA, M.F.; ISHIMOTO, M.; MIRKOV, T.E.; COLUCCI, G.; BATEMEN, K.; CHRISPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta: An International Journal of Plant Biology**, v. 203, p. 295–303, 1997.

GRUSAK, M. A. Enhancing mineral content in plant food products. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 21, p. 178–183, 2002.

GUAJARDO-FLORES, D., SERNA-SALDÍVAR, S. O., GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Evaluation of the antioxidante and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris L.*). **Food Chemistry**. v. 141, p. 1497-1503, 2013.

HACKBART, H. C. S. Biodegradação de aflatoxinas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2013.

HACKBART, H. C. S., MACHADO, A. R., CHRIST-RIBEIRO, A., PRIETTO, L., BADIALE-FURLONG, E. Reduction of aflatoxins by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*. **Mycotoxin Research**. v. 30, p. 141-149, 2014.

HAN, Z., ZHENG, Y., LUAN, L., CAI, Z., REN, Y., WU, Y. An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in traditional Chinese medicines. **Analytica ChimicaActa**. v. 666, p. 165-171, 2010.

HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A Kunits trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides Michx.*): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**. v. 46, n.3, p.347-359, 2001.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R., MENDES, G. L., SCAGLIONI, P. T., BADIALE-FURLON, E., SOUZA-MORAES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**. v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HEFNAWY, T. H. Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). **Annals of Agricultural Science**. v. 56, p. 57-61, 2011.

HUSSEIN, H. S., BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**. v. 167, p. 101-134, 2001.

- INMETRO, (2003) - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2003.
- JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**. v. 33, p. 87-92, 2013.
- KADOZAWA, P.; FIGUEIRA, E. L. Z.; JÚNIOR, A. L. M.; GERAGE, A. C.; LAZZARI, S. M. N.; ONO, E. Y. S.; MIZUBITI, I. Y.; HIROOKA, E. Y. Atividade inibidora de amilase e protease de milho contra *Fusarium verticillioides* durante a germinação. **Ciências Agrárias**. v. 27, n. 2, p. 231-242, 2006.
- KAHKONEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 37, n.10, p. 3954-3962, 1999.
- KHAYOONA, W. S., SAADA, B., LEEA, T. P., SALLEH, B. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in chilli, peanut and rice using silica based monolithic column. **Food Chemistry**. v. 133, p. 489-496, 2012.
- KIM., J. H.; YU, J.; MAHONEY, N.; CHAN, K. L.; MOLYNEUX, R. J.; VARGA, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; NIERMANN, W. C.; CAMPBELL, B. C. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 122., p. 49-60, 2008.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BERTHILLER, F.; MOLINELLI, A.; MIZAIKOFF, B. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. **Food Additives and Contaminants**. v. 22, n. 4, p. 345–353, 2005.
- KUMAR, N.; PROTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**. v. 4 p. 86–93, 2014.
- LAI, X.; ZHANG, H.; LIU, R.; LIU, C. Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 22, p. 176-180, 2015.
- LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131–137, 2005.
- LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9.623-9.635, 2006.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v.193, pp. 265-275, 1951.
- LUTHIRIA, D. L., PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, p. 205–211, 2006.

MACZÓ, A.; CUCU, T.; MEULENAER, B.; GELENCSEÉR, É. Comparison of the alpha-amylase inhibitor-1 from common beans and transgenic pea expressing the bean alpha-amylase inhibitor-1 by means of LC–TOF–MS. **Food Research International**. Article in press, 2014.

MAPA. Instrução Normativa nº 12, de 28 de março de 2008. **Ministério da Agricultura e Agropecuária**, 2008. Disponível em: <www.codapar.pr.gov.br/arquivos/feijaoinstrucaonormativa1208.pdf> Acesso em: 05 dez. 2014.

MAZIERO, M. T., BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**. v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MCCUE, P. P.; SHETTY, K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. v. 13, n. 1, p. 101-106, 2004.

MCLEAN, M., DUTTON, M. F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 65, p. 163-192, 1995.

MEERDINK, G. Mycotoxins. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 1, n. 2, p. 89-93, 2002.

MEGDICHE-KSOURI, W., TRABELSI, N., MKADMINI, K., BOURGOU, S., NOUMI, A., SNOUSSI, M., BARBRIA, R., TEBOURBI, O., KSOURI, R. Artemisia campestris phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**. v. 63, p. 104-113, 2015.

MENDES, G. R. L., ALVES, C. L., CAVALHEIRO, P., BADIALE-FURLONG, E. Ação antifúngica de inibidores de α amilase extraídos de trigo (*Triticum aestivum* L.). **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 2, n. 3, p. 79-81, 2013.

MENEZES, E. W.; LAJOLO, F. M.; LEITE, M. S. Determinação do conteúdo de amido resistente no feijão: comparação de métodos. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF LATIN AMERICAN AND CARIBBEAN SECTION – AOAC INTERNATIONAL. São Paulo. Anais... São Paulo: University of São Paulo, p. 41, 1995.

MESQUITA, F. R.; CORRÊS, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade proteica. **Ciênc. agrotec., Lavras**. v. 31, n. 4, p. 1114 - 1121, 2007.

MOJICA, L., MEYER, A., BERHOW, M. A., MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food research international*. doi: 10.1016/j.foodres.2014.12.007. 2014.

MOREAU, R. L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B. Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan Ltda, 2010.

- NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cooking Effects on Iron and Proteins Content of Beans (*Phaseolus Vulgaris L.*) by GF AAS and MALDI-TOF MS. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 23, p. 156-162, 2012.
- NARITA, Y., INOUE, K. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I. **Food Chemistry.** v. 127, p. 1532-1539, 2011.
- KAMATOU, G. P. P., VILJOEN, A. M., STEENKAMP, P. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. **Food Chemistry.** v. 119, p. 684-688, 2010.
- LATIN AMERICAN AND CARIBBEAN SECTION – AOAC INTERNATIONAL, 1., 1995, São Paulo. **Anais...** São Paulo: University of São Paulo, p. 41, 1995.
- MENEZES, T. J. B. Fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v. 31, n. 2, 1992.
- MESQUITA, F. R.; CORRÊS, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*): Composição química e digestibilidade proteica. **Ciênc. agrotec., Lavras.** v. 31, p. 1114-1121, 2007.
- MIRA, N.V.M.; MASSARETTO, I.L.; PASCUAL, C.S.C.I.; MARQUEZ, U.M.L. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa L.*) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis.** v. 22, p. 405-409, 2009.
- MORAES-DE-SOUZA, R. A.; OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; ALENCAR, S. M. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of food technology.** v. 29, n. 2, p. 229-236, 2011.
- MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SOUZA, M. C.; DIAS, C. T. S. Composição de cultivares de soja submetidos a diferentes tratamentos térmicos. **Alimentos e Nutrição.** v. 18, n. 2, p. 151-160, 2007.
- NIELSEN, S. S. Digestibility of legume protein. **Food Technology,** v. 45, p.11-114, 1991.
- NJOBEB, P. B.; DUTTON, M. F.; KOCH, S. H.; CHUTURGOON, A. STOEY, S.; SEIFERT, K. Contamination with storage fungi of human food from Cameroon. **International Journal of Food Microbiology.** v. 135, p. 193-198, 2009.
- OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIÁLE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição.** v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.
- OSBORNE, T.B. The vegetable proteins. **Longmans,** London, 1924.
- PAGNUSSATT, F. A., BRETANHA, C. C., GARDA-BUFFON, J., BADIÁLE-FURLONG, E. Extraction of fungal amylase inhibitors from cereal using response surface methodology. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science.** v1., p. 428-434., 2011.

- PAGNUSSATT, F. A.; MEZA, S. L. R.; GARDA-BUFFON, J.; BADIÁLE-FURLONG, E. Procedure to Determine Enzyme Inhibitors Activity in Cereal Seeds. **Journal of Agricultural Science**. v. 4, n. 12; p. 85-92, 2012.
- PAGNUSSATT, F. A., BRETANHA, C. C., SÍLVIA, L. R. M., GARDA-BUFFON, J.; BADIÁLE-FURLONG, E. Activity of rice bran proteic extracts against *Fusarium graminearum*. **African Journal of Agricultural Research**. v. 8., p. 6283-6290., 2013.
- PAULA, J. N. L. M. **O uso potencial do inibidor de α -amilase de trigo 0.53 no controle de bruquídeos**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; PEREIRA, C. A.; MARQUES, T. R.; SÁTIRO, L. C. Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos. **Alimentos e Nutrição**. v. 21, n.1, p. 15-20, 2010.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; CRUZ, G. A. D. R.; MENDES, F. Q.; RESENDE, S. T.; MOREIRA, M. A. Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**. v. 16, n.2, p. 157-162, 2005.
- PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v. 3, n.1, p. 51-64, 2011.
- PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação de multirresíduo de pesticida em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- PRIETTO, L. Operações de pós-colheita do arroz e seus impactos nos níveis de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2014.
- RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; REYNOSO-CAMACHO, R.; MENDOZA-DÍAZ, S.; LOARCA-PIÑA, G. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. **Food Chemistry**. v. 161, p. 2014.
- RAZZAGHI-ABYANEH, M., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., CHANG, P. K. Mechanisms of Inhibition by Antagonistic Plants and Microorganisms, **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.): USA, 2011
- REHMAN, Z.; SALARIYA, A. M.; ZAFAR, S. I. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry** v. 73, p. 351–355, 2001.
- RESENDE, O.; ALMEIDA, D. P.; COSTA, L. M.; MENDES, U. C.; SALES, J. F.; Adzuki beans (*Vigna angularis*) seed quality under several drying conditions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 32, p. 151-155, 2012.

- REITER, E.; ZENTEK, J., RAZZAZI, E. Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.53, n. 4, p. 508-524, 2009.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S.; MELO, L. F. C. 2004. **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**. Química Nova. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, A. C. F. C. **Análise molecular de lectinas em sementes de leguminosas**. 2008. Tese de doutorado – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009. Disponível em: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/257>. Acesso em: 24 de set. 2013.
- RIBEIRO, N. D.; LONDERO, P. M. G.; HOFFMANN JUNIOR, L.; POERSCH, N. L.; CARGNELUTTI FILHO, A. Dissimilaridade genética para teor de proteína e fibra em grãos de feijão dos grupos preto e de cor. **Revista brasileira de agrociência**. v. 11, n. 2, p. 167-173, 2005.
- RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**. v. 6. p. 235-253, 1980.
- RUADREW, S.; CRAFT, J.; AIDOO, K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. **Food and Chemical Toxicology**. v. 55, p. 653–658, 2013.
- RUBERT, J., DZUMANB, Z., ZACHARIASOVA, M., SOLER, C., HAJŠLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. **Talanta**. v. 99, p. 712-719, 2012.
- RUBERT, J., SOLER, C., MANES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS. **Talanta**. v. 85, p. 206-215, 2011.
- RUI, X.; BOYE, J. I.; RIBEREAU, S. Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. **Food Research International**. v. 44, p. 2497-2504, 2011.
- SAN, R. H. C.; SHAN, R. I. M. Inhibitory effect of phenolic compounds on aflatoxin B 1 metabolism and induced mutagenesis. **Mutation Research**. v. 177, p. 229-239, 1987.
- SÁNCHEZ-MATA, M. C.; CÁMARA, M.; DÍEZ-MARQUÉS. Extending shelf-life and nutritive value of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.), by controlled atmosphere storage: micronutrients. **Food Chemistry**. v. 80, p. 317-322.
- SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Dry beans of *Phaseolus*: a review I. Chemical composition: proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 20, p. 1-46, 1984.
- SCAGLIONI, P. T.; SOUZA, T. D.; SCHMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**. v. 60, p. 1-7, 2014.

SERRANO, J.; GOÑI, I. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, p. 36-44, 2004.

SGARBIERI, V. C.; ANTUNES, P. L.; ALMEIDA, L. D. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1306-1308, 1979.

SHEIBANI, A.; HASSAN, S.; GHAZIASKAR. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B₁ and B₂ from pistachio. **Food Control**. v. 20, p. 124–128, 2009.

SHIMELIS, E. A.; RAKSHIT, S. K.. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. **LWT**. v. 38, p. 331-338, 2005.

SHIN, H. S., SATSU, H., BAE, M., ZHAO, Z., O, H., T, M., SHIMIZU, M. Anti inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. **Food Chemistry**. v. 168, p. 167-175, 2015.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, A. G., ROCHA, L. C., CANNIATTI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade proteica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**. v. 20, p. 591-598, 2009.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: Inibidores de protease e lectinas. **Revista de nutrição**. v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ocratoxina A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SOARES, A. G.; MODESTA, R. C. D.; CARVALHO, J. L. V. Avaliação tecnológica de algumas cultivares de feijão visando avaliar as suas reais potencialidades de consumo. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5, 1996, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA, p. 495-500, 1996.

SOUZA, M. M.; RECARTE, V. M.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.2, n.68, p.26-34, 2009.

SWEENEY, M. J., DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**. v. 43, p. 141–158, 1998.

SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT, J. **Progress in Food Contaminants Analysis**. London: Blackie Academic and Professional, p. 65-146, 1996.

SUTIVISEDSESAK, N.; CHENG, H. N.; WILLET, J. L.; LESCH, W. C.; TANGSRUD, R. R.; BISWAS, A. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Research International**. v. 43, p. 516-519, 2010.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L. T.; FULL, G. H.; WONG, R. Y.; HARDEN, L. A.; EDWARDS, R. H.; BERRIOS, J. D. J. Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 7040–7043, 2003.

TANAKA, M. A. S.; CORRÊA, M. U. Influência da *Aspergillus* e *Penicillium* no armazenamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 6, n. 3, p. 451-456, 1981.

TOVAR, J.; BJÖRCK, I.; ASP, N. G. Digestibility of starch in legumes using the rat. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 141-142, 1992.

TOWNSEND, C. A.; McGUIRE, S.M.; BROBST, S. W.; GRAYBILL, T. L.; PAL, K.; BARRY, C. E. Examination of tetrahydro- and dihydrobisfuran formation in aflatoxin biosynthesis: from whole cells to purified enzymes. **Secondary-Metabolite Biosynthesis and Metabolism**. Petroski RJ, McCormick SP (Eds.): Plenum Press, New York, U.S.A, p. 141-154, 1991.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. **Embrapa: Documento 353**. Belém, PA. 1ª ed. Versão electronica, 2009.

TURNER, N. W., SUBRAHMANYAM, S., PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**. v. 632, p. 168-180, 2009.

VANCE, C. P.; GRAHAM, P. H.; ALLAN, D. L. Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. In FO Pedrosa, M Hungria, MG Yates, WE Newton, eds, Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. **Kluwer Academic Publishers**. Dordrecht, The Netherlands, pp 506–514, 2000.

VANDENBOSCH, K. A.; STACEY, G. Summaries of legume genomics projects from around the globe. Community resources for crops and models. **Plant Physiology**. v.131, p. 840–865, 2003.

WANG, T. L.; DOMONEY, C.; HEDLEY, C. L.; CASEY, R.; GRUSAK, M. A. Can We Improve the Nutritional Quality of Legume Seeds? **Plant Physiology**. v. 131, p. 886-891, 2003.

WANG, W.; GUO, J.; ZHANG, J.; PENG., J.; LUI, T.; XIN, Z. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. *Food Chemistry*. v. 171., p. 40-49., 2015.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**. v. XXX, p. XXX-XXX, 2013.

Xu, B.J., Yuan, S.H., & Chang, S.K.C. Comparative analyses of phenolic composition antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes.

Journal of Food Science. v. 72, p. 167-177, 2007.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolic, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chem.**, v. 88, p. 503-509, 2004.

APÊNDICE 1

Figura 10 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão carioca azuki.

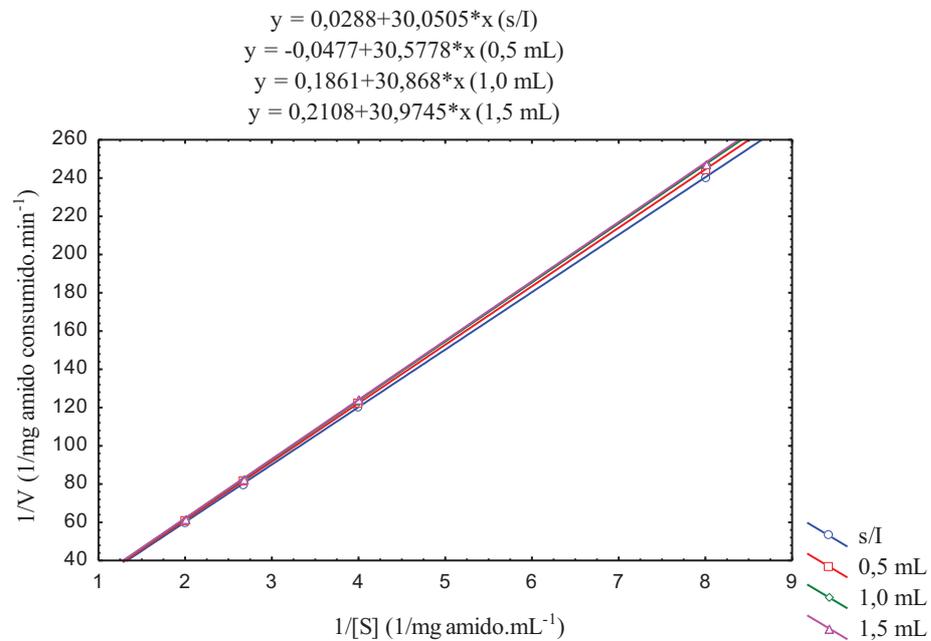


Figura 11 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão carioca amendoim.

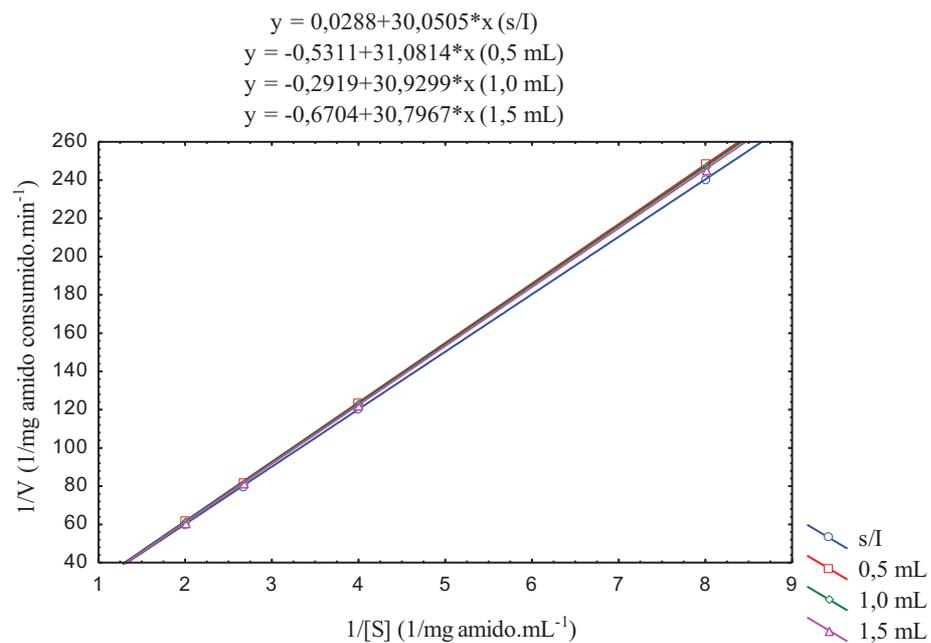


Figura 12 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão carioca.

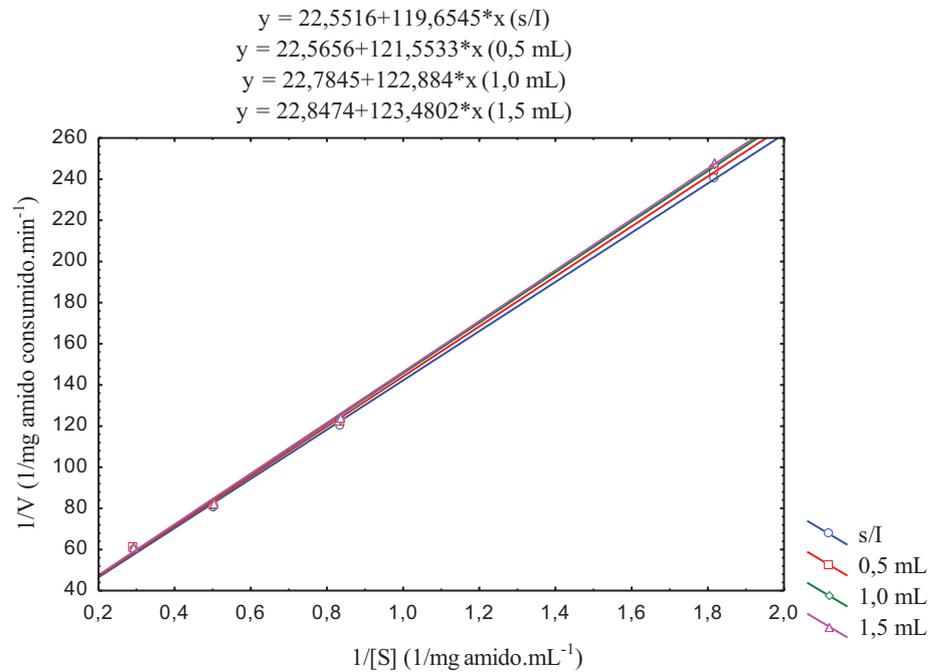


Figura 13 - Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o feijão fradinho.

