

A Nossa
Universidade

Colégio dos Jesuítas
Rua dos Ferreiros - 9000-082, Funchal

Tel: +351 291 209400
Fax: +351 291 209410
Email: gabinetedareitoria@uma.pt

DM

Avaliação de Recursos Genéticos Agrícolas:
Análise nutricional e anti-nutricional de variedades
regionais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Carla Susana Silva Gouveia



Avaliação de Recursos Genéticos Agrícolas:
Análise nutricional e anti-nutricional de variedades
regionais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Susana Silva Gouveia

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA


UNIVERSIDADE da MADEIRA
A Nossa Universidade
www.uma.pt

Setembro | 2011

DIMENSÕES: 45 X 29,7 cm

PAPEL: COUCHÊ MATE 350 GRAMAS

IMPRESSÃO: 4 CORES (CMYK)

ACABAMENTO: LAMINAÇÃO MATE

NOTA*

Caso a lombada tenha um tamanho inferior a 2 cm de largura, o logótipo institucional da UMA terá de rodar 90°, para que não perca a sua legibilidade/identidade.

Caso a lombada tenha menos de 1,5 cm até 0,7 cm de largura o layout da mesma passa a ser aquele que consta no lado direito da folha.



Avaliação de Recursos Genéticos Agrícolas:
Análise nutricional e anti-nutricional de variedades
regionais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Susana Silva Gouveia

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO
Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho

Agradecimentos

Agradeço profundamente a todos aqueles que se encontram e aqueles que já passaram pelo Banco Germoplasma ISOPlexis, pela camaradagem, amizade, apoio incondicional, sugestões e discussões de ideias, não deixando de agradecer à Paula Caldeira por todo o apoio prestado nos primeiros passos desta difícil caminhada, como o Filipe Ganança e o Gregório Freitas no acompanhamento da derradeira etapa final.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Miguel Ângelo de Carvalho, por toda a disponibilidade e apoio demonstrados em todas as fases da realização deste trabalho, bem como todo o esforço e dedicação efectuados para conservar toda a equipa fantástica e excepcional que me integro.

Todos aqueles que tutorei e auxiliei, estimulando-me intelectual e emocionalmente, despertando em mim um enorme prazer e simultaneamente um maior sentido de responsabilidade em toda a minha actividade.

Aos meus amigos, em especial à Marta Moreira, por todos os momentos únicos, aconselhamento e companheirismo dedicados à minha pessoa nestes últimos tempos.

À minha pedra basilar, a família! Aos meus pais, por todo o amor, apoio e escolta incondicional que me têm oferecido ao longo da vida; aos meus irmãos pelos arrufos típicos e momentos de cumplicidade; e às minhas três estrelinhas cintilantes: Rúben, Diogo e Sara, por todo o mimo e afecto mútuo que me renova a energia, alegria e força de viver a cada nova semana que me deparo... simplesmente complementam a minha alma.

Ao banco de germoplasma ISOPlexis e Universidade da Madeira, por todos os meios disponibilizados para a realização deste trabalho.

Para finalizar, dedico o mais profundo agradecimento a todos que de uma forma directa ou indirecta tornaram possível a realização deste trabalho.

Resumo

O presente trabalho teve como objectivo proceder à avaliação da qualidade nutricional de 20 variedades regionais de *Phaseolus vulgaris* L. e à análise comparativa dos parâmetros bioquímicos (nutricionais e anti-nutricionais) obtidos recorrendo às técnicas analíticas convencionais por *química molhada* e de NIRS (*Near Infra-Red Spectroscopy*).

Uma tipificação das variedades regionais de feijão foi realizada recorrendo a sete parâmetros ou caracteres (*traits*) nutricionais compreendidos em humidade, proteína bruta, lípidos totais, açúcares solúveis, amido, cinzas e minerais. A faseolamina foi incluída na tipificação do feijão como parâmetro anti-nutricional enquanto inibidor de enzimas digestivas.

A variedade que apresentou uma melhor qualidade nutricional foi o *feijão vermelho* (ISOP 00724), enquanto que o *feijão Filipe* (ISOP 00478) apresentou uma maior actividade inibitória da PPA (amilase do pâncreas suíno), contribuindo de igual forma como uma característica de qualidade deste feijão.

A aplicação de técnicas de quimiometria na quantificação dos vários parâmetros de qualidade nutricional, através da técnica de NIRS, permitiu o desenvolvimento dos modelos PLS globais após a colecção dos valores de referência e obtenção dos respectivos espectros de cada ISOP em análise. A análise comparativa dos parâmetros nutricionais, recorrendo às técnicas analíticas convencionais por *química molhada* e de NIRS, permitiu relacionar os parâmetros cinzas e proteína bruta como os principais critérios nutricionais para distinção das variedades regionais quanto à sua qualidade, ao diferirem significativamente relativamente aos parâmetros restantes.

A partir destas duas técnicas, conclui-se que a espectroscopia NIR associada a técnicas de análise multivariada consegue quantificar os parâmetros em estudo, permitindo distinguir amostras das variedades regionais, quanto às suas características nutricionais, exigindo uma preparação reduzida da amostra, com conseqüente custo de análise muito reduzido.

Este trabalho representou o início de uma base de fenotipagem a partir de caracteres nutricionais, estabelecendo-se um perfil das variedades regionais de feijão e avaliação da importância dos caracteres na sua distinção e tipagem.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.; caracteres (*traits*) nutricionais e anti-nutricionais; *química molhada*; NIRS (*Near Infra-Red Spectroscopy*).

Abstract

The aim of this study was to evaluate the nutritional quality status of 20 regional varieties of *Phaseolus vulgaris* L. and proceed to comparative analysis of the results for biochemical parameters (nutritional and anti-nutritional) obtained by wet chemistry using conventional analytical techniques and NIRS technique (Near Infra-Red Spectroscopy).

A regional classification of varieties of beans was carried out using seven nutritional parameters or characters (traits) comprehended by moisture, crude protein, total lipids, soluble sugars, starch, ash and minerals. The phaseolamin was included in the classification as a bean digestive enzyme inhibitor has an anti-nutritional trait.

The variety with the best nutritional quality was the *vermelho's* bean (ISOP 00724), while the *Filipe* bean (00478) had a highest inhibitory activity of PPA (Porcine Pancreatic Amylase), contributing equally to the bean nutritional quality.

The application of chemometrics techniques to quantify the various nutritional parameters, using the NIRS technique allowing the development of the global PLS models after the collection of reference values and obtaining the corresponding ISOP's spectra. The comparative analysis of nutritional parameters, using the conventional analytical techniques for wet chemistry and NIRS allowed to relate the parameters ash and crude protein as the main nutritional criteria for distinguishing regional variety as to its quality, differ significantly in relation to the remaining parameters.

From these two techniques, we conclude that NIR spectroscopy combined with multivariate analysis can quantify the parameters under study and allows the distinction of the regional variety, using nutritional traits, requiring a reduced sample preparation, with subsequent analysis at very low cost.

This work represents the beginning of a phenotyping database from the nutritional traits, establishing a profile of regional varieties of beans and assessing the importance of character and distinction in their typing.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L.; nutritional and anti-nutritional characters (traits); wet chemistry; NIRS (*Near Infra-Red Spectroscopy*).

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vii
Índice de Tabelas	ix
Índice de Figuras.....	x
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	
2.1. Recursos genéticos e variedades de feijão da Madeira	3
2.2. A cultura do feijão.....	4
2.2.1. Origem do feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	4
2.2.2. Taxonomia do Género <i>Phaseolus</i>	4
2.2.3. Características da semente de feijão	5
2.2.4. Importância económica e mundial.....	5
2.3. Propriedades nutricionais e anti-nutricionais do feijão comum.....	6
2.3.1. Propriedades nutricionais.....	7
2.3.1.1. Minerais e Cinzas	7
2.3.1.2. Proteínas	12
2.3.1.3. Hidratos de Carbono	15
2.3.1.3.1. Amido.....	16
2.3.1.3.2. Glucose.....	17
2.3.1.4. Lípidos	18
2.3.2. Propriedades anti-nutricionais.....	20
2.3.2.1. Faseolamina - Inibidor de enzimas digestivas (α -amilase)	20
2.4. NIRS - Espectroscopia na Região Próxima do Infravermelho.....	25
2.4.1. Origem do espectro NIR	26
2.4.2. Quimiometria	28
2.4.2.1. Pré-tratamento espectral.....	28
2.4.2.1.1. Correção de Difusão Multiplicativa	29
2.4.2.1.2. Variação de Padrão Normal	29
2.4.2.1.3. Derivadas.....	29
2.4.2.2. Análise Multivariada	31
2.4.3. Testes Estatísticos.....	32
3. Material e Métodos	35
3.1. Preparação das Farinhas	35
3.2. Composição centesimal pelo método convencional.....	37
3.2.1. Humidade relativa.....	37
3.2.2. Cinzas.....	37
3.2.3. Lípidos	37

3.2.4. Açúcares solúveis totais	38
3.2.5. Amido	38
3.2.6. Proteína Bruta.....	38
3.2.7. Minerais	39
3.3. Composição centesimal por NIRS	40
3.4. Faseolamina (Inibição da PPA)	40
3.5. Tratamento e análise estatística dos resultados	42
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Propriedades nutricionais da semente do feijão comum	43
4.1.1. Variação dos parâmetros nutricionais nas sementes de feijão comum	43
4.1.1.1. Resíduo Seco	47
4.1.1.2. Hidratos de Carbono	48
4.1.1.2.1. Amido.....	49
4.1.1.2.2. Açúcares solúveis	49
4.1.1.3. Lípidos Totais.....	50
4.1.1.4. Proteína Bruta e Azoto	51
4.1.1.5. Cinzas.....	52
4.1.1.5.1. Minerais	52
4.2. Avaliação da composição centesimal da semente de feijão por NIRS	55
4.2.1. Desenvolvimento do modelo de calibração PLS	55
4.2.1.1. Resíduo Seco	60
4.2.1.2. Proteína Bruta.....	61
4.2.1.3. Lípidos totais.....	62
4.2.1.4. Açúcares solúveis	64
4.2.1.5. Amido.....	65
4.2.1.6. Cinzas.....	66
4.3. Propriedades anti-nutricionais da semente do feijão comum	68
4.3.1. Variação de faseolamina (α -AI) no feijão comum.....	68
4.4. Comparação e análise dos parâmetros nutricionais e anti-nutricionais.....	72
4.4.1. Correlação entre ISOPs nos diferentes parâmetros nutricionais e anti-nutricionais	72
4.4.2. Análise de variância simples (<i>One-Way</i> ANOVA) e comparação múltipla.....	73
4.4.3. Análise multivariada por componentes principais (PCA)	74
5. Conclusão	77
6. Perspectivas futuras	79
7. Referências Bibliográficas	80
8. Anexos	82

Lista de Abreviaturas

- α -AMS** – α -Amilase
- α -AI** – Faseolamina (*α -Amylase Inhibitor*)
- DDR** – Dose Diária Recomendada
- DET** – *detrend*
- E** – Enzima (PPA)
- EI** – Complexo enzima-inibidor (PPA- α -AI)
- ES** – Complexo enzima-substrato (PPA-Amido)
- ESI** – Complexo enzima-substrato-inibidor (PPA-Amido- α -AI)
- ha** – Hectare
- I** – Inibidor (α -AI)
- IR** – Infravermelho (*Infrared*)
- ISOP** – Código utilizado para os acessos do Banco de Germoplasma ISOPlaxis
- KDa** – Kilodalton
- K_i** – Constante de dissociação do complexo EI
- K_i'** – Constante de dissociação do complexo EIS
- K_m** – Constante de Michaelis-Menten
- MLR** – Regressões Lineares Multivariadas (*Multiple Linear Regression*)
- mM** – Milimolar
- MPLS** – Regressão Modificada por Mínimos Quadrados Parciais (*Modified Partial Least Squares*)
- MS** – Matéria Seca
- MSC** – Correção de Difusão Multiplicativa (*Multiplicative Scatter Correction*)
- NIRS** – Espectroscopia na Região Próxima do Infravermelho (*Near Infra-Red Spectroscopy*)
- Nm** – Nanómetro
- PCA** – Análise multivariada por componentes principais (*Principal Component Analysis*)
- PCR** – Regressão por Componentes Principais (*Principal Components Regression*)
- PHA** – Lectina (*Phytohemagglutinin*)
- PHA-E** – Lectina eritoaglutinante (*Phytohemagglutinin erythroagglutinating*)
- PHA-L** – Lectina leucoaglutinante (*Phytohemagglutinin leukoagglutinating*)
- PLS** – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*)
- PPA** – Amilase do pâncreas suíno (*Porcine Pancreatic Amylase*)
- R²** – Coeficiente de Correlação ou de Determinação Múltiplo (*Coefficient of Correlation* ou *Multiple Determination*)
- RER** – Retículo Endoplasmático Rugoso
- rpm** – Rotações por minuto (*Revolutions per minute*)
- RS** – Amido Resistente (*Resistant Starch*)

S – Substrato (Amido)

SD – Desvio Padrão (*Standard Deviation*)

SEC – Erro Padrão da Calibração (*Standard Error of Calibration*)

SEC(C) – Erro padrão da calibração corrigida pela Bias (*Standard Error for Calibration Corrected for Bias*)

SECV – Erro Padrão da Validação Cruzada (*Standard Error of Cross-Validation*)

SEP – Erro Padrão da Previsão (*Standard Error of Prediction*)

SEP(C) – Erro padrão da previsão corrigida pela Bias (*Standard Error for Prediction Corrected for Bias*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNV – Variação de Padrão Normal (*Standard Normal Variate*)

t – Tonelada

V_{max} – Velocidade máxima (saturação) da reacção cinética

Índice de Tabelas

Tabela I. Lista dos acessos (ISOPs) de feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) utilizados no estudo.....	36
Tabela II. Valores médios dos ISOPs por parâmetro determinados por <i>química molhada</i> (g/100g MS).....	44
Tabela III. Análise descritiva da composição centesimal do feijão comum (g/100g MS de farinha).....	45
Tabela IV. Composição mineral média do feijão comum em agrupamentos distintos, em MS de farinha.	45
Tabela V. Análise descritiva da composição mineral do feijão comum em MS de farinha. ...	46
Tabela VI. Composição mineral média do feijão comum em agrupamentos distintos, em MS de farinha.	47
Tabela VII. Valores da composição da farinha de feijão nos conjuntos de calibração e validação determinados por gravimetria ou espectrofotometria, em g/100g MS (ou % MS).....	58
Tabela VIII. Dados estatísticos para o conjunto de calibração	58
Tabela IX. Previsão por NIRS dos parâmetros de composição centesimal a partir dos dados de referência (bancada) em g/100g MS.....	59
Tabela X. Previsão por NIRS do teor de Resíduo Seco de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.	61
Tabela XI. Previsão por NIRS do teor de Proteína Bruta de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.	62
Tabela XII. Previsão por NIRS do teor de Lípidos Totais de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.	63
Tabela XIII. Previsão por NIRS do teor de Açúcares solúveis de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.	64
Tabela XIV. Previsão por NIRS do teor de Amido de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.	66
Tabela XV. Previsão por NIRS do teor de Cinzas de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.	67

Índice de Figuras

Figura 1. Classificação de carboidratos (adaptação de Kadlec [77]).....	15
Figura 2. Diagrama de protómeros da faseolamina (α -AI1), Arcelina (Arce-1) e Lectina (PHA-L). Representação de dois <i>loops</i> de conexão para formação do complexo entre (α -AI1) e PPA (*); representação de <i>loops</i> extra (**) – um <i>loop</i> (Arce-1) e dois <i>loops</i> (PHA-L) – que impedem a activação destas como substrato da PPA, respectivamente (adaptação de Santimone [123]).....	22
Figura 3. Complexo entre α AI-1 e PPA (RCSB PDB code 1 DHK); (*) sítio activo da faseolamina (adaptação de Santimone [123]).....	23
Figura 4. Localização das principais bandas de absorção na região NIR (Osborne [134])..	26
Figura 5. Análise de uma amostra de farinha em Reflectância Difusa (adaptação de Osborne [134]).....	27
Figura 6. Melhoria na definição espectral através de derivadas: linha sólida representa o sinal original composto por dois picos de curvas Gausseanas sobrepostos, e a tracejado encontra-se a segunda derivada do sinal original (Siesler [135]).....	30
Figura 7. Representação global dos espectros NIR do conjunto de calibração, em Absorvância (Log (1/R)) Vs Comprimento de Onda. a partir dos dados obtidos da análise centesimal do feijão por técnicas analíticas convencionais.....	56
Figura 8. Representação global de espectros NIR do conjunto de calibração, após tratamento matemático por SNV, DET e 1ª derivada (1,4,4,1).....	57
Figura 9. Recta de calibração para a previsão do Resíduo Seco obtida pelo modelo PLS.	60
Figura 10. Recta de calibração para a previsão da Proteína Bruta obtida pelo modelo PLS.	62
Figura 11. Recta de calibração para a previsão dos Lípidos Totais obtida pelo modelo PLS.	63
Figura 12. Recta de calibração para a previsão dos Açúcares Solúveis obtida pelo modelo PLS.	64
Figura 13. Recta de calibração para a previsão do Amido obtida pelo modelo PLS.	65
Figura 14. Recta de calibração para a previsão das Cinzas obtida pelo modelo PLS.....	66
Figura 15. Teste de Inibição do α -AI do acesso 00478 sobre a PPA.....	68
Figura 16. Gráfico representativo da inibição da PPA pelos ISOPs de feijão comum em percentagem média de inibição e respectivas barras de erro.	69
Figura 17. Representação gráfica da modelação da actividade da PPA na presença da α -AI do extracto dos ISOPs 00726 e 00877, com representação da quantidade respectiva de maltose libertada.	70

Figura 18. Interpretação linear directa das linhas definidas pelo substrato e velocidade da reacção do ISOP 00478, com intersecções dessas linhas nos símbolos a preto e branco, e médias dessas interacções em tons vermelhos.	71
Figura 19. Representação dos auto-valores que demonstram de que forma todos os parâmetros nutricionais contribuem para a distribuição espacial dos ISOPs na análise PCA.	74
Figura 20. Análise efectuada com os resultados da caracterização nutricional dos componentes principais (PCA). Delimitação em círculo de 3 <i>clusters</i> distintos.	75
Figura 21. Representação gráfica das funções canónicas 1 e 2 para determinação dos centróides de cada <i>cluster</i> identificado na análise PCA.	76

1. Introdução

O *Phaseolus vulgaris* L. é a leguminosa de maior consumo à escala mundial devido à sua composição bioquímica e qualidades nutricionais. Mais comumente conhecido como feijão comum, este apresenta qualidades nutricionais consideradas benéficas para a saúde humana ao possuir características hipocolesterolémicas, hipoglicémicas e elevado teor proteico (Guzmán-Maldonado [1]; Rios [2]; Pujolà [3]). A semente, nutricionalmente mais rica do que a vagem, é a forma mais consumida do feijão, embora as suas folhas sejam igualmente consumidas como verdura (Broughton [4]).

O feijão, domesticado na América, encontra-se amplamente distribuído por todo o mundo como principal fonte proteica, actuando como substituto directo da proteína animal, embora dependa de tratamentos térmicos para aumentar a sua palatabilidade e biodisponibilidade nutricional (Granito [5]; Bonett [6]).

A agricultura tradicional tem vindo a decair em todo o mundo em prole do aumento da produção agrícola intensiva, acarretando perda de biodiversidade e qualidade nutritiva de praticamente todos os recursos genéticos para consumo. Em Portugal, as práticas agrícolas tradicionais têm persistido com a preservação significativa de diversidade, sendo necessário o estudo das suas potencialidades agronómicas e nutricionais, por forma a valorizar a qualidade do produto agrícola tradicional (Rodiño [7]). Algumas variedades de feijão possuem um mecanismo de defesa natural (faseolamina) contra a infestação por coleópteros, mais propriamente por *Callosobruchus maculatus* F. e *Callosobruchus chinensis* L., minimizando de alguma forma os prejuízos na sua produção. Por outro lado, a faseolamina tem sido alvo de estudo como complemento dietético para controlo de peso e eventualmente da diabetes (Schroeder [8]; Celleno [9]; Boniglia [10]; Obiro [11]).

O valor económico das variedades tradicionais de *Phaseolus vulgaris* depende do seu rendimento, taxa de maturidade, resistência a doenças, tamanho da semente, cor, qualidade nutricional, tempo de cozedura, sabor e textura quando cozinhado. Na realidade, o critério de selecção de uma cultivar baseia-se na sua resistência a doenças e a stresses abióticos, rendimento e taxa de maturação, mas raramente na qualidade nutricional, saltando logo à vista que estes critérios encontram-se direccionados apenas para o lucro e rentabilidade da cultivar e não para a qualidade e benefícios nutricionais (Shimelis [12]).

Desta forma, torna-se imperativo estudar as variedades de feijão comum na Região Autónoma da Madeira (RAM), dado o isolamento geográfico e orografia desta, de modo a podermos valorizar estes recursos ao nível nutricional e anti-nutricional destas mesmas culturas. Apesar de existirem alguns trabalhos sobre *landraces* de feijão de Portugal continental que envolvem a caracterização do germoplasma português (Rodiño [7]; Martins [13]; Stoilova [14]; Coelho [15]) ou Ibérico (Espanha e Portugal) (Rodiño [16]; Rodiño [17]), este estudo é pioneiro em relação à Madeira, em complemento ao estudo que tem vindo a

ser realizado ao nível bioquímico (faseolinas) e morfo-agronómico das variedades regionais de *Phaseolus vulgaris* L.

Dado que o material para este estudo provém do banco de germoplasma ISOPlaxis, responsável pela prospecção, recolha, manuseamento e conservação desta cultura na Região Autónoma da Madeira (R.A.M.), é imperativo avaliar estes recursos genéticos. Deste modo, este estudo permitirá uma avaliação quanto à qualidade nutricional das variedades do feijão comum, identificando aquelas que mais se adequarão ao mercado regional ou nacional.

A análise bioquímica (nutricional e anti-nutricional) será realizada em amostras de variedades regionais de feijão comum, recorrendo a técnicas analíticas convencionais de *química molhada* e de NIRS (*Near Infra-Red Spectroscopy*). Terá como objectivo avaliar o conjunto de caracteres (parâmetros) e fazer selecção e distinção entre amostras com base na qualidade nutricional dos mesmos. Este estudo permitirá não só uma valorização dos recursos de feijão da região, como facultará a validação da técnica NIRS, técnica essa que se encontra na vanguarda da análise nutricional e do controlo de qualidade, proporcionando desta forma uma avaliação e comparação da sensibilidade e reproducibilidade de ambas as técnicas.

Esta dissertação encontra-se dividida em capítulos, que incluem a introdução, com uma revisão bibliográfica de modo a situar a importância deste estudo na abordagem da cultura e dos recursos genéticos ao nível regional e mundial, seguindo-se o material e métodos, descrição e análise dos resultados, finalizando com a sua discussão e apresentação de conclusões.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Recursos genéticos e variedades de feijão da Madeira

Acompanhando a tendência mundial, a produção de feijão em Portugal tem vindo a decrescer devido às modificações nos sistemas de produção agrícola e nos hábitos de consumo e alimentação da população portuguesa. Porém, as práticas agrícolas tradicionais em Portugal ainda continuam a ser realizadas pelos agricultores, mantendo o cultivo das suas próprias variedades (*landraces*) ao longo de gerações (Rodiño [7]).

No arquipélago da Madeira, a agricultura tradicional ainda tem um grande peso, permitindo uma agricultura sustentada. Devido à orografia da ilha, a agricultura é condicionada a sistemas agrícolas confinados a pequenos terrenos (*poios*) distribuídos desde o nível do mar até os 700 a 800 metros de altitude, em vales isolados e de grande inclinação, com declives médios compreendidos entre os 16 e os 25% (Pinheiro de Carvalho [18]). O solo vulcânico possui condições edáficas específicas que se pressupõem ter reflexos nas características nutricionais das variedades locais de feijão (Pinheiro de Carvalho [18]). As práticas agrícolas tradicionais, a introdução de material de propagação originário de diferentes partes do mundo e o isolamento geográfico deram origem a uma grande diversidade de recursos genéticos entre as diversas culturas praticadas na ilha. Esta diversidade permite a realização de estudos morfo-agronómicos, moleculares, bioquímicos e nutricionais, com o objectivo de avaliar a diversidade de recursos genéticos e identificar caracteres (*traits*) que permitam a sua valorização (Rodiño [7]). A cultura do feijão no arquipélago baseia-se predominantemente no cultivo do feijoeiro comum (*P. vulgaris*) e na feijoca (*P. coccineus*) (Turland [19]).

Os recursos genéticos locais são designados por variedades de conservação ou *landraces*. Segundo Camacho Villa [20], *landrace* é uma população ou conjunto de populações dinâmicas de uma espécie agrícola que tem uma origem histórica comum com identidade distinta e não melhorada, conferida por um conjunto de caracteres específicos, diversidade genética e adaptabilidade às condições agro-climáticas locais, estando associada a sistemas tradicionais de cultivo.

As *landraces*, deste modo, são recursos agrícolas muito importantes, visto o seu uso em pequena escala pelos agricultores minimizar os riscos de perda de diversidade genética e qualidade nutricional da cultura, relativamente à produção em larga escala que promove a produtividade em detrimento da qualidade (Rodiño [7]; Coelho [15]).

2.2. A cultura do feijão comum

O feijão comum (*P. vulgaris*) é uma das espécies agrícolas mais antigas em todo o mundo. Desde a sua domesticação até à actualidade, esta cultura conseguiu ser a base da alimentação humana em vários países, possuindo uma grande importância económica. O lugar ocupado na alimentação torna-o objecto de investigação quanto às suas potencialidades para a saúde humana.

2.2.1. Origem do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

Dados arqueológicos e análises por datação com carbono catorze realizadas no Perú, Estados Unidos e México, no século XIX, confirmaram a origem Mesoamericana e Andina do *P. vulgaris*. Estes dados puseram fim à especulação de Linnaeus, no século XVIII, que considerava a Ásia o local de origem do feijão comum (Gepts [21]; Bewley [22]). Estudos conjecturam que o feijão comum sofreu vários processos de domesticação, que se reflectem na variabilidade genética e na distribuição das espécies parentes silvestres (CWRs) ao longo da América Central. A domesticação do feijão remonta à 5000 anos a.C., em simultâneo com a domesticação do milho (Gepts [23]; Gepts [21]; Langer [24]; Pickersgill [25]; Brink [26]).

O feijão comum chegou à Europa no século XVI, introduzido pelos Portugueses e Espanhóis, após a descoberta do continente Americano, disseminando-se por todo o continente (Langer [24]; Rodiño [16]; Brink [26]). Cristóvão Colombo e Cortés terão sido possivelmente os responsáveis pela sua introdução na Europa, a partir da América Central e do México, respectivamente (Rodiño [16]).

2.2.2. Taxonomia do Género *Phaseolus*

Linnaeus (1753) definiu o género *Phaseolus*, situando-o na subtribo Phaseolinae, tribo Phaseolae, subfamília Papilionoidae, família Fabaceae (Leguminosae) e classe Dicotyledoneae (Hidalgo [27]; Freytag [28]; Brink [26]).

Este género compreende cerca de cinquenta espécies, originárias predominantemente do continente Americano, das quais apenas cinco foram domesticadas: o *P. coccineus*; *P. lunatus*; *P. vulgaris*; *P. acutifolius* e *P. angularis* (Hancock [29]; Brink [26]; Coelho [15]).

O *P. vulgaris* é vulgarmente conhecido como “feijão” ou “feijoeiro” (feijão comum), derivado do latim *faseolum* ou *phaseolum* (Graham [30]; Rodiño [7]; Brink [26]). O nome vulgar *feijão* é também atribuído a espécies pertencentes a géneros distintos. Inúmeras designações vulgares pelas populações para identificar as formas por si cultivadas, podendo

diferentes espécies ou variedades apresentar o mesmo nome vulgar (nome vernáculo) ou mesma espécie ou variedade apresentar designações diferentes consoante a região ou localidade em que se cultiva. Esta arbitrariedade na atribuição dos nomes pelos agricultores origina inúmeros problemas na correcta identificação das espécies ou variedades, cuja utilização continuada origina o aparecimento de antónimos (antonímias) ou sinónimos (sinonímias) (Ferrão [31]).

Os nomes vulgares atribuídos pelos agricultores geralmente não coincidem com as variedades botânicas ou *landraces* da espécie agrícola, sendo estas atribuídas com base numa característica ou qualidade particularmente apreciada pelo agricultor. Lowe [32] relatou a existência de grande diversidade de nomes para identificar os feijões cultivados na Madeira, tais como “Amarelo”, “Dourado”, “Menino”, “De-bala” e “De-lisboa”, etc.

Actualmente, o Banco de germoplasma ISOPlexis possui uma colecção de referência dos recursos genéticos de feijão, tendo procedido à identificação das *landraces* regionais desta cultura, utilizando descritores morfo-agronómicos na avaliação de cinquenta populações representativas da diversidade de feijão na região, permitindo a correcta identificação de 15 *clusters* de feijão, passíveis de serem consideradas de variedades (Freitas [33]).

2.2.3. Características da semente de feijão

O feijão tem um período de formação e amadurecimento da semente que varia entre 60 a 270 dias, após a sementeira. A semente apresenta externamente um revestimento espesso (tegumento), hilo e micrópilo; internamente possui dois cotilédones que envolvem o embrião formado pela radícula, hipocótilo, epicótilo e plúmula (Hidalgo [27]; Bewley [22]; Russell [34]).

A semente apresenta tamanhos, formas e cores muito diversificadas de acordo com as variedades cultivadas. A forma e tamanho da semente poderá ser oval, cilíndrica, redonda ou em rim, apresentando um peso médio de cem sementes que varia entre as 15 e 100 gramas (Hidalgo [27]; Bewley [22]).

A coloração da semente tem uma ou várias tonalidades, que varia quanto à distribuição da cor, variando entre o uniforme, às manchas, listado ou pintalgado e a conjugação de padrões, existindo padrões brancos, amarelos, creme, castanhos, vermelhos, roxos e até pretos (Bewley [22]).

2.2.4. Importância económica e mundial

As leguminosas como a ervilha (*Pisum sativum* L.), grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), lentilhas (*Lens culinaris* Med.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), entre outros, são geralmente

ricas em nutrientes, podendo ser consumidas tanto a fresco (vagem) como a seco (semente), fundamentando o enorme consumo mundial de leguminosas (Costa [35]).

O feijão comum é leguminosa mais cultivada no mundo a seguir ao grão-de-bico, com uma produção entre os 18 e 23 milhões de toneladas, sendo cultivada em aproximadamente 100 países (Broughton [4]). Esta espécie contribui para cerca de 95% da produção mundial de feijão, devido à sua grande variabilidade morfológica e adaptabilidade a diferentes ambientes (Tharanathan [36]; Bonett [6]; Mesquita [37]). Em Portugal continental e ilhas, a produção de feijão rondou as 4000 toneladas (t) no ano de 2007, embora alguns valores apresentados pela FAO englobem outras espécies do género *Phaseolus* nesta estatística (FAO [38]). Em 2010, a RAM produziu 1.120t de feijão maduro em 75ha e 1.610t de feijão verde em 90ha de área (INE [39]). Sendo a agricultura na RAM condicionada devido à sua orografia e limitações em termos de área agrícola, a produção anual desta cultura consegue ser extremamente competitiva relativamente à produção em Portugal continental, evidenciando uma importante competitividade em termos de produção e rentabilidade em termos económicos desta leguminosa.

O feijão possui um valor nutricional que torna lucrativo o seu cultivo pois, por razões económicas ou religiosas e culturais, constitui muitas das vezes a principal fonte de proteína na dieta alimentar da população mundial (Bonett [6]; Mesquita [37]). Langer [24] refere que o feijão contribui em 18 a 25% para a substituição de proteínas animais nos países da América Latina e África, onde o consumo de proteína animal (carne) é economicamente mais limitado (Costa [35]; Shewry [40]). Outros autores referem a contribuição com um teor de 18 a 35% de proteína bruta, essencialmente na forma de faseolinas (Sgarbieri [41]; Hillocks [42]). O feijão, enquanto fonte de proteína, é mais rico do que as dietas à base de cereais, como arroz, cevada e milho, que podem contribuir com 5,8 a 7,7%, 8 a 15% e 9 a 11% das necessidades diárias de proteína, respectivamente (Shewry [40]).

2.3. Propriedades nutricionais e anti-nutricionais do feijão comum

A confecção de vegetais, essencialmente leguminosas, permite um maior aproveitamento nutricional em relação a outros alimentos, visto o grão ou semente serem consumidos integralmente (Hillocks [42]; Blair [43]).

O feijão contém alguns factores anti-nutricionais, essencialmente ao nível da casca, que podem comprometer a qualidade nutricional do grão na ausência de processamento térmico. Estes factores reduzem a qualidade nutricional da dieta ao comprometerem a biodisponibilidade de proteínas, minerais e hidratos de carbono (Granito [5]). Desta forma a presença de algumas substâncias tóxicas, como os inibidores de tripsina e a presença de hemaglutininas (lectinas), ou o défice de aminoácidos (metionina) e o tipo de armazenamento são os causadores directos da fraca digestibilidade do feijão (Kakade [44];

Berrios [45]). Apesar disso, a cultura do feijão tem vindo a ser fomentada em países desenvolvidos, não só devido ao seu teor proteico, mas também devido à sua riqueza em fibras alimentares e minerais (essencialmente Ferro), com efeitos benéficos para a saúde humana (Guzmán-Maldonado [1]; Rios [2]; Pujolà [3]).

Outro constituinte do feijão que se encontra em estudo é a faseolamina (inibidor da α -amilase), que se caracteriza por conferir resistência a pragas, mais propriamente de bruquídeos do feijão, com a introdução deste tipo de resistência em ervilhas transgênicas (Schroeder [8]; Huesing [46]). De momento, a faseolamina encontra maior aplicação como suplemento dietético para controlo da digestão dos hidratos de carbono, sendo uma mais valia para o controlo do peso e de uma forma indirecta, da diabetes (Lajolo [47]; Celleno [9]; Boniglia [10]; Obiro [11]).

Vários estudos têm sido realizados com o objectivo de desenvolver novos produtos alimentares à base de farinha de feijão, com aplicações distintas na panificação, dado as suas propriedades nutricionais e ausência de glúten na sua composição, ao contrário da farinha de trigo (Kaur [48]; Siddiq [49]), no melhoramento de produtos à base de carne e como complemento nutricional proteico e dietético (Dzudie [50]; Duranti [51]; Celleno [9]; Boniglia [10]; Obiro [11]).

Estes e outros aspectos serão abordados de seguida de forma mais detalhada, focando algumas das propriedades do feijão de maior interesse para este trabalho.

2.3.1. Propriedades nutricionais

Os legumes, de um modo geral, caracterizam-se pelos teores elevados de proteína, minerais e baixo índice glicémico e lipídico, com efeitos benéficos no controlo de doenças cardiovasculares, diabetes, doenças do tracto digestivo e controlo de peso/obesidade. De todos os parâmetros estudados no feijão, a proteína é sem dúvida o parâmetro nutricional de maior importância, devido à sua constituição e propriedades nutracêuticas (Duranti [51]).

A composição química da semente de feijão tem sido estudada pelos benefícios nutricionais relacionados com o teor de proteína, de hidratos de carbono e fibras solúveis, de modo a identificar as variedades com maiores potencialidades nutracêuticas (Sathe [52]). Sathe [52] publicou um trabalho de revisão sobre a funcionalidade da proteína do feijão, bem como um levantamento onde compara o feijão comum com outras espécies quanto à sua composição química.

2.3.1.1. Minerais e Cinzas

Os legumes são considerados superiores aos cereais enquanto fonte de minerais considerando o feijão como uma boa fonte de fósforo, magnésio, manganês, ferro, zinco,

cálcio e cobre. O feijão é considerado a melhor fonte de ferro (seguido da carne), contribuindo com 23 a 30% de dose diária recomendada por refeição (Shimelis [12]). O conteúdo dos minerais consegue ser preservado durante o processamento devido à presença do tegumento no feijão, fornecendo diariamente cerca de 20% das necessidades do organismo em relação a estes nutrientes (Broughton [4]; Blair [43]).

Os minerais, elementos essencialmente inorgânicos, desempenham um papel fundamental na estrutura de várias hormonas e enzimas do organismo. Estes dividem-se principalmente em macro e micronutrientes, sendo obtidos através da alimentação, embora apresentem biodisponibilidade limitada nos alimentos ingeridos. Os ultra-micronutrientes são minerais necessários no organismo em quantidades vestigiais, mas potencialmente indispensáveis ao seu normal funcionamento e saúde (Navarra [53]).

Os principais minerais obtidos na dieta, alguns com funções vitais no organismo, são:

- *Macronutrientes*

- Cálcio (Ca): é o elemento mais abundante no organismo humano, 99% do seu conteúdo está presente na constituição dos ossos e dentes, sendo o restante distribuído pelo sistema circulatório. O cálcio é essencial na prevenção de osteoporose, trombose, controle da pressão arterial, no funcionamento dos nervos e na contracção muscular. A deficiência deste nutriente pode conduzir à osteoporose ou a uma maior sensibilidade muscular e conseqüentemente a câimbras. Quando presente em excesso no organismo, poderá conduzir à formação de pedra nos rins e actuar como interferente na absorção de ferro e zinco por parte do intestino (Navarra [53]). Em média, um adulto deverá consumir diariamente 800mg de cálcio derivado de produtos lácteos e legumes (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54]; Navarra [53]).
- Potássio (K): apresenta função ao nível muscular, na contracção do músculo esquelético; participa na conversão da glucose em glicogénio para fins de armazenamento energético no fígado; participa na transmissão de impulsos nervosos no Sistema Nervoso Central (SNC) (Navarra [53]). Encontra-se essencialmente nos legumes, grãos, vegetais, cuja dose diária recomendada (DDR) para um indivíduo adulto situa-se nas 2 gramas (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54]). O défice de potássio provoca diarreia e vómitos a curto prazo, arritmias cardíacas e conseqüentemente falhas cardíacas (fatal) a longo prazo. Os teores tóxicos podem provocar

hipercalcemia com conseqüente fraqueza muscular e eventual falha cardíaca (Navarra [53]).

- Magnésio (Mg): com uma recomendação diária de 375 mg para indivíduos adultos, este torna-se essencial para o normal funcionamento de músculos e nervos, estando directamente relacionado com o relaxamento muscular e transmissão de impulsos nervosos no SNC (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54]; Navarra [53]). Cerca de 40% deste elemento encontra-se nos músculos e nos tecidos moles do organismo, enquanto que apenas 1% se distribui no sistema circulatório e esquelético. Participa na síntese proteica e na conversão de hidratos de carbono, proteínas e lípidos em energia. Este elemento existe em alimentos não processados, mais propriamente em nozes, legumes, bananas, entre outros. Em caso de deficiência, o organismo sofre tremores musculares, espasmos, anorexia, náuseas, vômitos e uma diminuição nos reflexos dos tendões. Quando presente em excesso no organismo, tem um efeito laxativo (Navarra [53]; World Health Organization [55]).

- Fósforo (P): é o segundo mineral mais abundante no organismo, sendo um dos maiores componentes dos ossos e dentes (1P:2Ca), encontrando-se cerca de 85% deste elemento no esqueleto. O fósforo existe praticamente em todo o tipo de alimentos, embora a carência deste mineral no sistema conduza à perda óssea, fraqueza, anorexia e dores, enquanto que em excesso haverá uma conseqüente diminuição dos níveis de cálcio no sangue (Navarra [53]). São necessárias cerca de 700 gramas para satisfazer as necessidades diárias deste mineral num adulto (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54]).

- *Micronutrientes*
 - Cobre (Cu): é um elemento metálico essencial, que se acumula no fígado, cérebro, coração, rins e cabelo. Este elemento desempenha um papel essencial na utilização do Fe na síntese da hemoglobina, e participa no metabolismo da vitamina C, na formação de pigmentos na pele (melanina), na recuperação da mielina dos nervos, entre outros. O Cu existe essencialmente em legumes, cereais, mariscos e órgãos animais, mais propriamente no fígado. Quando em déficit ou na presença de algum interferente na sua absorção (ex. Vitamina C) pode originar anemia, formação óssea pobre e um crescimento reduzido. Praticamente não

existem registos da existência de cobre em excesso no organismo (Navarra [53]). Um adulto deverá consumir diariamente 1 mg de Cu de modo a conseguir suprir a carência deste no organismo (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54])

- Ferro (Fe): cerca de 30% do ferro presente no organismo é armazenado no fígado, baço e medula, sob a forma de ferritina e hemosiderina, indispensáveis à formação da hemoglobina humana, citocromo e co-factores de outras enzimas essenciais à vida. O Fe tem participação activa no transporte de oxigénio nos tecidos e em reacções de oxidação nas células (World Health Organization [55]). Deverá ser consumido diariamente cerca de 14mg deste elemento, onde o encontramos essencialmente nas carnes vermelhas e leguminosas (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54]). Quando em défice, dá-se uma redução na quantidade e tamanho dos eritrócitos e hemoglobina, provocando a anemia (World Health Organization [55]).
- Zinco (Zn): componente de várias vitaminas antioxidantes e suplementos minerais com função na síntese proteica e divisão celular. Cerca de 70% do zinco é ingerido através da alimentação à base da carne, fígado, ovos, apresentando maior biodisponibilidade nestes do que em alimentos à base de grão (Navarra [53]; World Health Organization [55]). Um adulto deverá consumir diariamente cerca de 10 mg deste elemento (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54]). Quando em défice, ocorre a perda de apetite, anemia, perda de cabelo, fotofobia (sensibilidade à luz), enquanto que em excesso dá-se uma redução dos níveis de cobre podendo conduzir à origem de microcitoses (células sanguíneas de menor tamanho que o normal) (Navarra [53]; World Health Organization [55]).
- *Ultra-micronutrientes*
 - Boro (B): é um elemento não-metálico vestigial não-essencial, cuja função no corpo e na dieta humana permanece desconhecida. Alguma evidência aponta para a diminuição dos níveis de Boro em mulheres na pós-menopausa, aumentando o risco de osteoporose (Navarra [53]).
 - Manganês (Mn): é um elemento metálico essencial na síntese de algumas enzimas. No organismo, o Mn localiza-se na pituitária ao nível mitocondrial,

fígado, pâncreas, rins e ossos (Navarra [53]). É recomendado a adultos uma dose diária de 2mg deste elemento (Decreto-Lei n.º 54/2010 [54]).

A diminuição de consumo de legumes na dieta poderá levar ao défice de Fe e Zn, afectando essencialmente o crescimento e o sistema imunitário (Gelin [56]; Blair [43]), entre outros. Estes micronutrientes são definidos como elementos vestigiais e fazem parte de vitaminas necessárias ao funcionamento e à saúde do organismo, sendo requeridos em pequenas quantidades, as quais são obtidas através da dieta alimentar (Blair [43]). Estes elementos encontram-se essencialmente ao nível da casca e, ao serem consumidos sem a remoção desta, a digestibilidade do feijão fica comprometida de modo que torna-se imperativo o tratamento térmico (cozedura) do feijão, antes do consumo. Consoante o tratamento térmico submetido na cocção, a digestibilidade do feijão pode aumentar de 68,58% para 75,49% (Bhatty [57] ; Broughton [4]).

Os minerais são essencialmente determinados por incineração a 550°C, que leva à destruição dos compostos orgânicos deixando apenas os minerais sob a forma de cinzas. Esta técnica apresenta algumas limitações, pois na realidade dá-nos um valor aproximado do valor real do teor de minerais total, onde:

- não se inclui o azoto contido nas proteínas, mas inclui-se o fósforo e enxôfre das proteínas e lípidos;
- a presença de carbonatos por parte da decomposição da parte orgânica da amostra;
- a perda de elementos voláteis da amostra (ex: ferro, fósforo, zinco) (DeMan [58]).

De acordo com a bibliografia, no Anexo 1 encontram-se compilados os dados da composição inorgânica mineral do feijão comum. Para tal, considerou-se os dados referentes ao teor de minerais do feijão, como parte do teor de cinzas, que não foram submetidos a qualquer tipo de processamento físico que modificasse a sua composição (cozedura, colocar de molho, etc), de modo a ser comparável com os dados obtidos no nosso estudo. Segundo alguns dos autores citados e de um modo geral, o feijão apresenta um teor de cinzas situado entre os 2,0 e os 4,9 g/100g de matéria seca, com contribuição diária recomendada de macronutrientes (>100mg) e micronutrientes (<100mg) (DeMan [58]). Em complemento, Siddiq [49] e Kaur [48], registaram um teor de cinzas em farinha de feijão superior, obtendo valores máximos na ordem das 5,0 g/100g MS e 6,0 g/100g MS, respectivamente.

Na maior parte dos trabalhos de referência, as cinzas geralmente são utilizadas basicamente para a quantificação do teor de minerais em bruto sem realizar uma análise refinada dos minerais propriamente ditos, visto ser representativa de praticamente toda a matéria inorgânica da amostra.

2.3.1.2. Proteínas

O feijão é considerado uma excelente fonte de proteína, embora o teor de proteína disponível seja inferior ao da carne, devido ao facto das proteínas das leguminosas serem pobres nutricionalmente sem tratamento térmico prévio (Baudoin [59]).

A biodisponibilidade proteica nas leguminosas é limitada essencialmente pelo(a):

1) Armazenamento dos legumes secos por longos períodos de tempo, expostos a condições de calor e humidade, torna-os mais difíceis de cozinhar, requerendo um maior tempo de cozedura de modo a amaciar o cotilédone, impondo um maior gasto energético e consequente diminuição da sua qualidade nutricional (Berrios [45]).

2) Presença de compostos fenólicos geralmente existentes na casca que, quanto maior for a pigmentação existente, maior será a dificuldade de digestão da proteína (Nielsen [60]; Baudoin [59]).

Outros condicionantes como a composição aminoácida e a presença de alguns factores anti-nutricionais na própria semente, fazem com que o feijão apresente baixo valor nutricional na ausência de processamento térmico, o que lhe confere uma resistência aos ataques proteolíticos das enzimas digestivas (por parte dos mamíferos) (Nielsen [60]; Baudoin [59]).

As proteínas de reserva são armazenadas maioritariamente nos tecidos durante o desenvolvimento da semente, ao nível dos cotilédones (96% proteína total), embrião e casca sob a forma de globulinas (70% proteína total), gluteninas (10-20%) ou albuminas (10-20%) (Baudoin [59]). Estas são classificadas de acordo com a sua solubilidade, possuindo um alto peso molecular e fraca solubilidade em água, podendo por vezes diferir significativamente na sua composição aminoácida (Baudoin [59]; Pujolà [3]):

- Albuminas – solúveis em água (1,6S – 2,0S)
- Globulinas – solúveis em soluções salinas (7,0S – 13,0S)
- Prolaminas – solúveis em soluções de etanol aquoso
- Gluteninas – de difícil solubilização, apenas solúveis em soluções alcalinas, ácidas fracas ou SDS (detergente dodecil sulfato de sódio) (Sathe [52]; Duranti [51]; Pujolà [3]).

As globulinas são as proteínas de reserva existentes em maior abundância no feijão, sendo esta fracção constituída por duas proteínas Vicilina (7S) e Legumina (11S) (Sathe [52]; Duranti [51]). As globulinas de 7,0S e 11,0S (Vicilina e Legumina) tendem a ter baixo teor de aminoácidos com enxôfre (metionina, cisteína e triptofano) na sua composição, enquanto que por sua vez os cereais geralmente apresentam falta de lisina, treonina e triptofano, complementando-se deste modo cereais e leguminosas em respeito ao teor de lisina, metionina e cisteína (Duranti [51]; Pujolà [3]). O feijão apresenta limitações quanto à presença de metionina, seguido da leucina e triptofano, sendo estes mais limitados devido à

sua biodisponibilidade (Bressani [61]). A metionina é o aminoácido que se encontra em menor teor na proteína do feijão, visto este ser o intermediário na biossíntese da cisteína e cistina, sendo estes aminoácidos não essenciais igualmente limitativos no feijão (Sgarbieri [41]).

O papel nutricional das leguminosas é inquestionável, no que respeita à presença de macro e micronutrientes, onde a proteína desempenha sem dúvida um papel da maior importância na nutrição, tendo em conta a sua composição aminoácida que pode ser facilmente ponderada na dieta (Duranti [51]). As proteínas dos cereais e das oleaginosas são mais equilibradas que as proteínas das leguminosas, quanto à sua composição aminoácida (Pujolà [3]).

Regra geral, as proteínas de reserva não apresentam actividade catalítica ou enzimática, ou mesmo qualquer função estrutural no tecido do cotilédone, tendo apenas como função o fornecimento de azoto e enxofre durante a germinação (Mandal [62]; Duranti [51]). As proteínas de reserva são armazenadas em vacúolos de reserva (síntese via Aparelho de Golgi) ou corpos proteicos (síntese via Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) – leguminas e gluteninas do arroz) ao nível dos cotilédones, e conseguem sobreviver a períodos prolongados de dissecação durante a maturação da semente (Mandal [62]; Duranti [51]).

No cotilédone, as albuminas são as proteínas mais ricas em aminoácidos com enxofre e outros aminoácidos essenciais do que as globulinas, enquanto que os factores anti-nutricionais (inibidores de proteinases) presentes no tegumento contêm uma quantidade considerável de cisteína e metionina, podendo representar 30 a 40% da cisteína total da semente (Baudoin [59]).

Baudoin [59] observou uma diminuição nos valores de lisina e cisteína fornecendo à semente um ligeiro aumento de azoto, embora algumas sementes ainda continuem a apresentar uma quantidade considerável de enxofre (metionina e cisteína) (Fischer [63]). A adição de metionina como suplemento nutricional directamente no feijão, aumenta o rácio de eficiência proteica, mas não a digestibilidade da proteína em si (Bressani [61]). Por isso, o feijão geralmente é conjugado com outros alimentos, podendo ser complementado com carne. A conjugação com proteína animal faz com que haja uma suplementação de metionina livre proveniente da carne, aumentando a sua biodisponibilidade na dieta (Bhatty [57]). Outros complementos ao feijão podem ser baseados em dietas à base de cereais, raízes, tubérculos de algumas culturas e banana, de modo a compensar a deficiência em lisina e aminoácidos com enxofre (Baudoin [59]; Hillocks [42]).

Vários métodos são utilizados na determinação do teor de proteína nos alimentos, incluindo o método espectrofotométrico UV/Visível de Biureto (1849) e Lowry (1951), método por combustão de Dumas (1831) e o método de Kjeldahl (1883) que envolve digestão, destilação e titulometria da amostra, entre outros (Simonne [64]; Owusu-Apenten [65]). Na

análise alimentar, os métodos Biureto e Lowry são pouco práticos e sensíveis devido à presença de misturas complexas de proteína com outros componentes, sendo nestes casos mais indicado os métodos de Dumas e Kjeldahl (Simonne [64]; Owusu-Apenten [65]). Na determinação do teor de proteína em amostras biológicas, é muito corrente a utilização da técnica de Kjeldahl (1883) que basicamente mede o azoto orgânico e inorgânico contido na amostra (S_N – *sample nitrogen* – N(g) por 100g amostra) sob a forma de amónia, sendo posteriormente convertido para proteína bruta (cP – *crude protein*) através de um factor de conversão (F_K – *Kjeldahl factor* – Proteína (g) por N (g)) (Owusu-Apenten [65]).

$$cP(\%) = S_N \times F_K$$

O factor de conversão para a proteína animal ($F_K = 6,25$) é distinto da proteína vegetal ($F_K = 5,7$), o que poderá conduzir a uma sobrestimação do teor de proteína, assumindo que estas contêm em média cerca de 16% e 17,5% de azoto (N), respectivamente (Owusu-Apenten [65]). Idealmente deveria ser calculado um factor de conversão para cada tipo de amostra a partir do rácio entre o peso dos aminoácidos totais e aminoácidos azotados da mesma (Hui [66]).

Estudos realizados com diversas variedades de *P. vulgaris* na determinação do teor de proteína bruta por Kjeldahl, utilizando um factor de conversão $N \times 6,25$, registaram valores de proteína entre os 17,6 e os 32% em MS (Bhatty [57]; Onwuliri [67]; Shimelis [12]; Shimelis [68]; Mesquita [37]; Pujolà [3]; Coelho [15]; Shiga [69]; Saha [70]). Para suprir 98% da necessidade diária proteica em indivíduos adultos, estes necessitam de uma dieta que contenha entre as 46 e 56g de proteína (Institute of Medicine (U.S.) [71]). O feijão poderá contribuir entre 34 a 61% da necessidade diária total em fonte proteica, isto se tivermos em conta os teores proteicos que o feijão apresentou nos vários estudos acima referidos. Porém, o seu valor biológico torna-se menor do que o esperado para a sua constituição aminoácida e proteica, pelas razões anteriormente descritas sobre a sua biodisponibilidade (Sgarbieri [41]).

Mandal [62] refere que os factores ambientais, tais como a temperatura, nutrientes e hormonas, podem alterar a composição e quantidade de proteína na semente. A limitação de nutrientes como o enxôfre e azoto, leva a que haja uma diminuição de proteínas ricas em enxôfre e um menor estímulo de produção de proteínas de reserva nos cotilédones de várias cultivares de feijão, em comparação com outras proteínas derivadas de leguminosas e cereais (Singh [72]; Mandal [62]; Andrade [73]).

2.3.1.3. Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono – ou carboidratos – são substâncias com uma estrutura molecular compreendida por $C_x(H_2O)_y$, amplamente distribuídas na natureza. Os hidratos de carbono são importantes na alimentação, por serem a principal fonte energética no metabolismo humano, como por exemplo o amido, com DDR compreendida nas 130g para indivíduos adultos (Institute of Medicine (U.S.) [71]; Izydorczyk [74]; Liu [75]).

Os hidratos de carbono encontram-se nos tecidos animal e vegetal, e possuem funções de reserva (amido, glicogénio, frutanos), estrutural (celulose, xilano), protectora (polissacarídeos que induzem síntese de proteínas) e de reconhecimento celular (glicoproteínas, glicolípidos) (Izydorczyk [74]).

Os hidratos de carbono podem ser divididos em dois grupos: carboidratos solúveis ou açúcares (mono-, di- e oligossacarídeos) e polissacarídeos (por exemplo o amido, glicogénio, celulose), como podemos observar na figura 1.

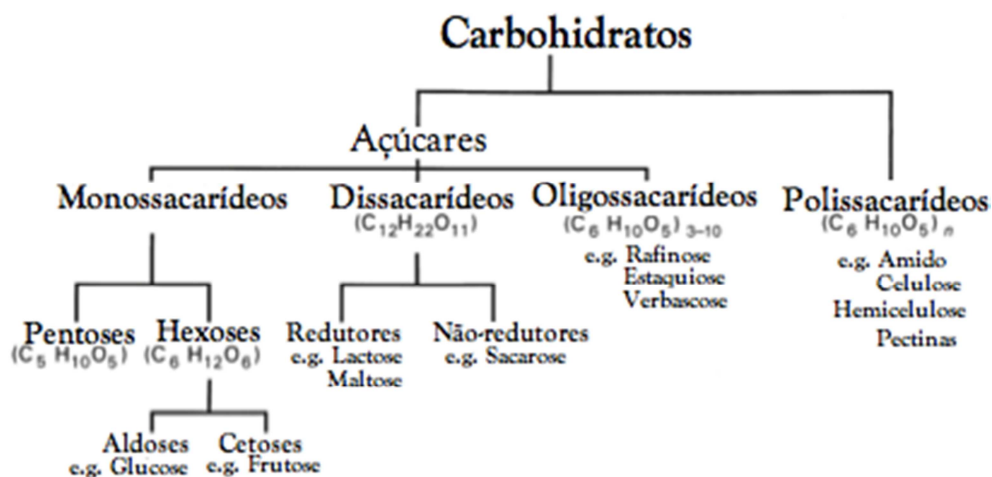


Figura 1. Classificação de carboidratos (adaptação de Kadlec [77]).

Os monossacarídeos são os açúcares de estrutura mais simples que não sofrem hidrólise, sendo os mais abundantes a glucose e a frutose (Izydorczyk [74]). De acordo com a estrutura do seu grupo carbonil, os monossacarídeos obtêm a designação de aldeídos (polihidroxi-aldeídos) ou de cetonas (polihidroxi-cetonas). A classificação do açúcar é dada de acordo com o número de carbonos na cadeia monossacarídea (geralmente entre 3 a 9): trioses (C3), tetroses (C4), pentoses (C5), hexoses (C6), etc. (Figura 1).

O teor de açúcares solúveis nas sementes de feijão geralmente é reduzido, apresentando variação entre os 2,0 e os 9,6 g/100g MS (Kozłowska [76]).

As leguminosas são uma boa fonte de oligossacarídeos, tais como α -galactósidos (rafinose, estaquiase e verbascose), sendo estes os factores causadores de flatulência

característica da ingestão de feijão (Granito [5]). Os α -galactósidos são formados por 1–3 unidades de galactose com ligações α -1,6 à sacarose e, como as ligações à sacarose não são hidrolisadas no tracto gastro-intestinal devido à ausência da enzima α -galactosidase, dá-se a fermentação de açúcares pela microflora intestinal com produção de gases flatulentos, dor abdominal e diarreia (Aguilera [78]).

2.3.1.3.1. Amido

O amido é a maior reserva energética de hidratos de carbono nas plantas, sendo sintetizado durante a fotossíntese, envolvendo processos biológicos complexos e armazenado sob a forma de grânulos (relativamente densos e insolúveis em água) nos cloroplastos (folha) ou amiloplastos (parênquima de raízes, tubérculos, endosperma ou cotilédones de sementes) (Liu [75]; Amaral [79]). As principais fontes de amido são os tubérculos (inhame-90%), raízes tuberosas (batata-doce-75%), cereais (trigo-67%; arroz-89%; milho-57%) e leguminosas (feijão-42%) (Liu [75]).

O amido é um homopolímero composto por várias unidades de α -D-glicopiranosil, ou seja, por várias moléculas de glicose (monossacarídeo, aldohexose) ligadas entre si por ligações glicosídicas (Sajilata [80]). O amido nos vegetais é constituído por duas fracções moleculares, mais propriamente pela amilose (polissacarídeo de cadeia linear de estrutura amorfa, ou seja, sem estrutura definida) e a amilopectina (polissacarídeo de cadeia ramificada de estrutura cristalina) (Sajilata [80]; Sinnott [81]). De um modo geral, o amido é constituído por 25% de amilose e 75% de amilopectina. O feijão contém um teor médio de amido total situado entre os 37 e os 50 g/100g MS (Sawazaki [82]; Kozłowska [76]; Rodiño [7]; Rodiño [16]; Pujolà [3]; Eyarú [83]).

A amilopectina é a principal fracção do amido, e dada a sua estrutura cristalina e densamente ramificada, esta dificulta a solubilização do amido em água, conferindo-lhe uma menor digestibilidade (Kadlec [77]; Amaral [79]). Durante a confecção térmica dos legumes, ocorre um processo de gelatinização do amido, que torna a sua estrutura mais susceptível à acção hidrolítica da α -amilase (Eyarú [83]). O amido é hidrolisado em maltose (dissacarídeo) pela acção da α -amilase do pâncreas, que por sua vez é hidrolisada em glucose (monossacarídeo) pela actividade da maltase (EC 3.2.1.20) (Kadlec [77]; Amaral [79]). No entanto, nem todo o amido presente nos alimentos é completamente digerido e absorvido no intestino delgado (Vargas-Torres [84]).

De acordo com a sua estrutura e digestibilidade pela α -amilase do pâncreas, o amido divide-se em três classes: amido de rápida digestibilidade (RDS), amido de lenta digestibilidade (SDS) e amido resistente (RS) (Chung [85]). De acordo com Chung [85] e Eyarú [83], o teor de SDS e RDS no feijão é relativamente baixo, contrariamente ao RS que representa 35% dos 41,6% de amido presente na semente. Este elevado teor de amido

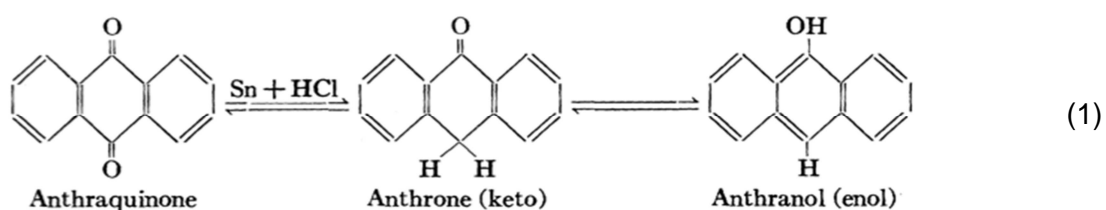
resistente é benéfico no controlo e redução do índice glicémico devido ao facto do amido no feijão não-processado encontrar-se no interior de grânulos, tornando-o praticamente indigerível devido à acessibilidade limitada das enzimas hidrolíticas (Chung [85]; Eyaru [83]). O RS é resistente ao processo digestivo no intestino delgado (devido à estrutura essencialmente cristalina) servindo de substrato para as bactérias fermentativas do intestino grosso, com produção de pequenas cadeias de ácidos gordos (Chung [85]). Outros factores, tais como inibidores enzimáticos, polifenóis, ácido fítico, lectinas e faseolaminas presentes nas sementes de leguminosas contribuem para a inibição da hidrólise do amido, diminuindo igualmente o índice glicémico (Sajilata [80]).

2.3.1.3.2. Glucose

A glucose é um monossacarídeo que constitui a base dos hidratos de carbono, mais propriamente os carboidratos solúveis, caracterizando-os como açúcares solúveis totais (Izydorczyk [74]).

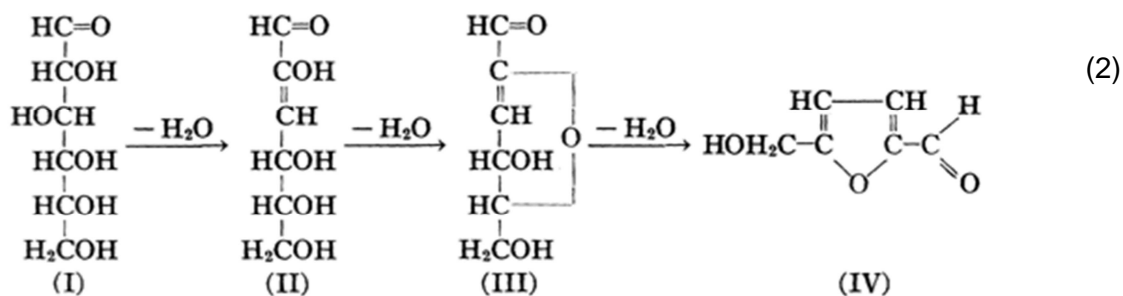
A reacção dos hidratos de carbono, com soluções de antrona-ácido sulfúrico (Roe [86]) ou fenol-clorofórmio (Dubois [87]), é utilizada para quantificar o amido e açúcares solúveis, tais como glucose e frutose nas amostras. O método de Dubois [87] é mais indicado do que o método de Roe [86] na determinação de polissacarídeos que contenham na sua constituição mais do que um tipo de açúcar, embora o fenol seja cancerígeno. Na determinação dos hidratos de carbono constituídos por glucose (dextrinas, amidos), o método de Roe afigura-se o mais indicado (Laurentin [88]).

O uso de antrona (9,10-dihidro-9-cetoantraceno) em ácido sulfúrico concentrado na detecção de hidratos de carbono foi introduzido por Dreywood em 1946, para as mais diversas aplicações (Bailey [89]; Beck [90]; Colvin [91]; Brooks [92]). A redução da antraquinona por acção do ácido clorídrico, permite obter a antrona (forma ceto) ou antranol (forma enol) (1).

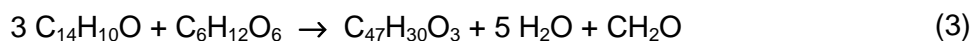


Beck [90] cita vários autores que postularam a possibilidade da formação de anéis entre hidratos de carbono e derivados de hidratos de carbono na presença de ácidos fortes. Como tal, a glucose (I) ao reagir com o ácido sulfúrico sofre um processo de desidratação

(II, III) até à formação de um derivado furaldeído designado de 5-hidroxi-metil-2-furaldeído (IV) (2).



O desenvolvimento e intensidade da cor verde-azulada na reacção da antrona depende da presença do 5-hidroxi-metil-2-furaldeído (IV), onde 3 moles de antrona reagem com 1 mole de glucose (3).



Segundo Dreywood [93], este método consegue detectar aproximadamente 1 parte de amido em 900 000 partes de água, mostrando-se extremamente sensível na quantificação colorimétrica de hidratos de carbono. Porém, este método apresenta limitações quanto ao prazo de validade do reagente de antrona em ácido sulfúrico concentrado, que exige a preparação diária, e devido à fotossensibilidade do reagente quando exposto à luz e ao ar (Colvin [91]).

O feijão apresenta na sua constituição, segundo vários autores, um teor relativo de açúcares solúveis entre os 3,8 e 6,5% (MS), com registos máximos nos 9% (MS), e valores médios nos 5% em MS (Sawazaki [82]; Kozłowska [76]; Rodiño [7]; Rodiño [16]; Altamirano-Hernández [94]).

2.3.1.4. Lípidos

A maior parte dos lípidos presentes em produtos como pão, farinha, produtos animais e lacticínios encontra-se ligado a proteínas e hidratos de carbono, cuja extracção directa recorrendo a solventes apolares mostra-se ineficiente, visto que apenas os solventes orgânicos (ex. clorofórmio, álcool, éter, hexano) conseguem solubilizar os lípidos, sendo estes completamente insolúveis em água (Pomeranz [95]). Estes lípidos têm de sofrer uma extracção prévia por hidrólise ácida ou outro tipo de método, como também se poderá recorrer a um processo de secagem antes da extracção, consoante o teor de humidade da amostra (Pomeranz [95]). Os solventes são geralmente escolhidos consoante a amostra e o

método a empregar dado que, por exemplo, o método de Soxhlet (1879) geralmente utiliza o hexano, o método de Folch [96] e Bligh [97] usam clorofórmio/metanol/água (Wrolstad [98]).

Folch [96] desenvolveu um método rápido de isolamento e purificação de lípidos a partir de tecidos animais, com uma simplificação do mesmo em 1959 por Bligh [97] com o intuito de economizar o método sem alterar a sua eficiência, mantendo a capacidade de recuperação mínima de 95% dos lípidos (Iverson [99]; Shahidi [100]). De tal modo, o método Bligh [97] continua a ser o mais recomendado para extracção dos lípidos totais em tecidos animais, vegetal ou mesmo em amostras bacterianas. Um homogenato da amostra é misturado com clorofórmio e metanol, com posterior diluição em água, permitindo a formação de duas fases: clorofórmio com lípidos solubilizados na parte inferior e o metanol com a fase não-lipídica solubilizada à superfície. O extracto puro contendo os lípidos é obtido a partir do isolamento da camada de clorofórmio (Pomeranz [95]; Smedes [101]).

Iverson [99] compara os métodos de Folch [96] e Bligh [97] em tecidos de peixe e concluíram não existir diferenças nas amostras com composição lipídica inferior a 2%. Porém, este método tem a desvantagem de em teores de lípidos superiores a 2% registar-se uma sub-estimação exponencial do teor lipídico real da amostra visto a quantidade utilizada de solventes orgânicos ser inferior em relação ao Folch (Iverson [99]).

O feijão possui valores extremamente baixos de teor lipídico (aproximadamente 2%), sendo aplicável o método de Bligh [97]. Os lípidos extraídos da semente de feijão são constituídos maioritariamente por triacilgliceróis e fosfolípidos, enquanto que os ésteres, ácidos gordos livres e diacilgliceróis existem em menor quantidade (Yoshida [102]; Yoshida [103]). De um modo geral, e segundo vários autores, o teor de lípidos em farinha de feijão varia entre os 0,67 e os 4,3% (MS), predominando nos 1,5% (Sawazaki [82]; Bhatti [57]; Rodiño [7]; Marzo [104]; Sathe [52]; Rodiño [16]; Shimelis [12]; Shiga [69]).

Durante a última década, o óleo extraído da semente de feijão tem vindo a ser alvo de estudos devido à elevada presença de ácidos gordos poliinsaturados da série ómega, nomeadamente os ácidos linoléico (18:2n-6) e linolénico (18:3n-3), sendo estes os precursores dos ácidos gordos altamente insaturados. Estes estudos têm o intuito de analisar os efeitos preventivos e terapêuticos do feijão nas doenças coronárias (Yoshida [102]; Yoshida [103]).

2.3.2. Propriedades anti-nutricionais

As propriedades anti-nutricionais do feijão estão relacionadas essencialmente com a actividade tóxica de algumas proteínas de leguminosas ou da sua acção na redução da biodisponibilidade dos nutrientes, directamente relacionados com problemas de baixa digestibilidade proteica e disponibilidade de minerais (Burbano [105]; Rios [2]).

As proteínas do feijão podem apresentar baixa digestibilidade devido à presença de lectinas, taninos e inibidores de proteases, como é o caso da tripsina (quando cru ou mal cozinhado), sendo necessário recorrer à sua inactivação por tratamento térmico de modo a não comprometer a integridade nutricional do feijão e a melhorar a sua palatabilidade (Antunes [106]; Genovese [107]; Mejia [108]; Bonett [6]). A toxicidade das lectinas leva ao aparecimento de necroses e úlceras no epitélio intestinal, comprometendo a absorção de nutrientes, enquanto que as lectinas do feijão são praticamente fitohemaglutininas com propriedades hemaglutinantes (Boniglia [10]).

O inibidor de tripsina reduz a acção desta protease ao nível da hidrólise de proteínas, reduzindo a biodisponibilidade das proteínas na dieta e conduzindo a limitações ao nível do crescimento (Mejia [108]; Shi [109]; Boniglia [10]).

A faseolamina, o principal factor anti-nutricional do feijão, é uma proteína inibidora da actividade da α -amilase durante a digestão e absorção de hidratos de carbono ao nível do intestino. Esta revelou-se de extrema importância em produtos dietéticos de tal forma que concentrados de feijão comum têm vindo a ser processados de modo a inactivar as lectinas e inibidores de tripsina, e a preservar a actividade da faseolamina (Boniglia [10]). Por outro lado, a faseolamina confere alguma resistência contra insectos da família Bruchidae, sendo utilizadas no controlo de pragas na cultura do feijão (Huesing [46]; Schroeder [8]; Mattar da Silva [110] e Svensson [111]).

2.3.2.1- Faseolamina - Inibidor de enzimas digestivas (α -amilase)

A faseolamina (α -AI) é uma glicoproteína oligomérica que tem por função a inibição da actividade da α -amilase (α -AMS), através da formação de um complexo enzima-inibidor (Le Berre-Anton [112]; Gibbs [113]; Lee [114]; Mosca [115]). A α -amilase ((1 \rightarrow 4)- α -D-glucan-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) é a enzima que catalisa a hidrólise das ligações (1 \rightarrow 4)- α -D-glicosídicas do amido, originando a libertação de produtos maioritariamente sob forma de α -D-maltose (duas unidades de glucose) e α -dextrina, como produto intermediário (Smith [116]; Desseaux [117]; Xie [118]).

A faseolamina encontra-se apenas na semente, ao nível do embrião e cotilédones, sendo sintetizada pelo Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), juntamente com outras proteínas, como as faseolinas e lectinas (Moreno [119]; Nasi [120]). Esta é considerada uma

proteína vacuolar pois, após processamento proteolítico e glicosilação no aparelho de Golgi, é transportada para vacúolos de reserva, sendo armazenada sob a forma de polipéptidos com 15 a 18 KDa.

Na natureza existem sete formas moleculares de α -AIs com sequências aminoácidas e estruturas tridimensionais semelhantes (Svensson [111]). O *Phaseolus vulgaris* L. possui uma ou mais faseolaminas, embora pouco se conheça acerca da sua estrutura e propriedades, assim como do respectivo mecanismo de inibição (Le Berre-Anton [112]; Lee [114]). Segundo Svensson [111] e Valencia-Jiménez [121], existem pelo menos duas isoformas da faseolamina (α AI) no feijão comum: a α AI-1 e α AI-2. Estas isoformas apresentam diferentes especificidades quanto à enzima alvo:

- α AI-1 – inibe a α -amilase presente na saliva humana (HSA), no pâncreas suíno (PPA) e em insectos, como o *Callosobruchus maculatus* F. e *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae) (Mattar da Silva [110]; Svensson [111]; Valencia-Jiménez [121]).
- α AI-2 – apenas actua em insectos, especificamente em *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae), sendo incapaz de inibir a α -amilase do pâncreas suíno (PPA) (Mattar da Silva [110]; Svensson [111]; Valencia-Jiménez [121]).

A α AI-1, obtida a partir de extractos de feijão é uma proteína oligomérica de conformação $\alpha_2\beta_2$ (43kDa), composta por subunidades glicopeptídicas, das quais duas subunidades α (7,8kDa) e duas subunidades β (14kDa) encontram-se ligadas entre si por ligações glicosiladas não-covalentes (Le Berre-Anton [112]; Le Berre-Anton [122]; Santimone [123]). A α AI-1 e arcelina (Arce) apresentam uma homologia da estrutura proteica com as lectinas (*phytohemagglutinin*, PHA), pertencendo ambas à mesma família de genes, com sequências genéticas semelhantes – *lectin-arcelin- α AI1* – sendo deste modo codificadas pela mesma família de genes das lectinas (Huesing [46]; Lee [114]; Svensson [111]; Santimone [123]).

A lectina (PHA), constituída por cinco tetrâmeros diferentes formados por duas cadeias polipeptídicas (PHA-E e PHA-L), apresenta propriedades hemaglutinantes devido à conexão de ambos os polipéptidos ao terminal do resíduo de galactose das glicoproteínas animais. A PHA-E apresenta propriedades eritoaglutinantes, enquanto a PHA-L apresenta propriedades leucoaglutinantes (Nasi [120]). A PHA-L, homóloga da faseolamina (α AI-1), não apresenta actividade inibitória similar à α AI-1 devido à existência de dois *loops* extra em relação à estrutura da α AI-1, que actuam como uma barreira na função de ligação à enzima alvo, a α -amilase (Figura 2) (Santimone [123]).

No entanto, tendo em consideração os tipos de lectinas presentes na semente do feijão, a PHA-E e PHA-L, é altamente improvável a faseolamina ser considerada uma lectina, embora apresente homologias com a sequência aminoácida da PHA-L (Pueyo

[124]). Com base neste pressuposto, Nasi [120] aponta estudos realizados com a α -AI e Arce, considerando-as como formas inacabadas da PHA, dado a faseolamina não ser exactamente uma lectina devido à ausência de *loops*, impossibilitando a ligação a hidratos de carbono, mais propriamente açúcares, não apresentando a toxicidade transmitida pelas propriedades hemaglutinante das PHA para os mamíferos.

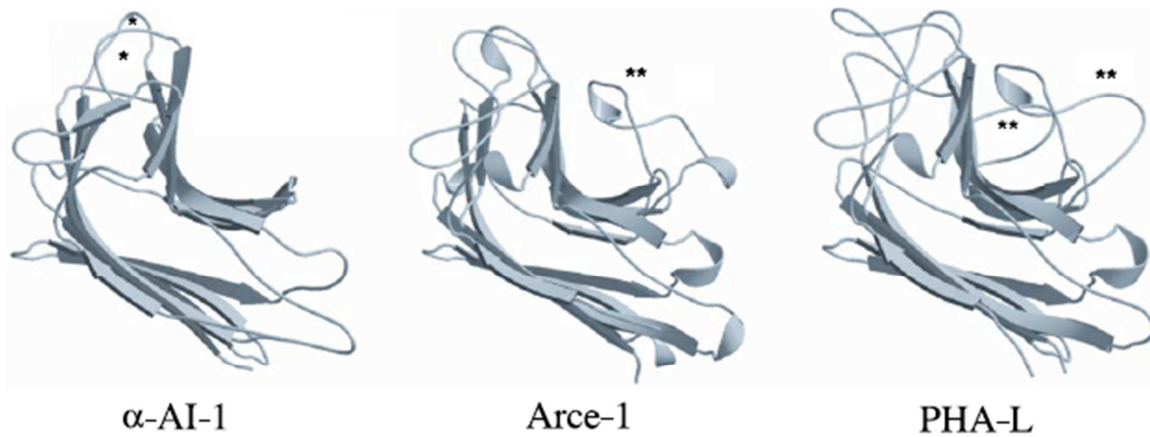


Figura 2. Diagrama de protómeros da faseolamina (α -AI1), Arcelina (Arce-1) e Lectina (PHA-L). Representação de dois *loops* de conexão para formação do complexo entre (α -AI1) e PPA (*); representação de *loops* extra (**) – um *loop* (Arce-1) e dois *loops* (PHA-L) – que impedem a activação destas como substrato da PPA, respectivamente (adaptação de Santimone [123]).

No entanto, a faseolamina apresenta um modo de acção típica de uma lectina relativamente ao mecanismo de defesa da semente para com insectos. Huesing [46] demonstraram que a lectina (PHA) ou isolectinas não são tóxicas em relação ao *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Insecta, Coleoptera, Bruchidae), citando outros autores que apoiavam o ponto de vista contrário. Huesing [46] constataram que a toxicidade apresentada pela PHA sobre o *C. maculatus* provinha da contaminação do PHA comercial por α AI-1 aquando a sua preparação. Assim a presença da α AI-1 na semente possui uma função protectora, conferindo resistência a escaravelhos (Coleoptera: Bruchidae) devido ao seu carácter tóxico que inibe a α -AMS do tubo digestivo das larvas (Le Berre-Anton [112]; Broughton [4]; Mattar da Silva [110]). Logo, a α AI-1 confere um maior controlo de pragas, como os escaravelhos na semente de feijão durante o seu armazenamento (Huesing [46]; Schroeder [8]; Mattar da Silva [110] e Svensson [111]).

A activação da faseolamina, o inibidor da α -AMS, seguido da sua acção no sítio activo da α -amilase, deve-se ao processamento proteolítico da cadeia polipeptídica do α AI-1, ao nível do aminoácido Asparagina - resíduo Asn77, com alteração da conformação inicial da proteína, originando duas cadeias α com os resíduos 1-77 e β com os resíduos 78-223, respectivamente (Pueyo [124]; Santimone [123]). Porém, de acordo com Le Berre-Anton [122] e Santimone [123], existe uma terceira isoforma de α -AI, isolada do *Phaseolus vulgaris*

cv. Rico 23 (α AI-3 ou α AI-L), que não apresenta qualquer tipo de inibição sobre a α -amilase, sendo considerado um intermediário das PHA, Arce e α AI. O α -AIL e a arce-1 possuem na sua estrutura o resíduo Asn77, mas não sofrem processamento proteolítico, o que impede a sua activação como inibidores da α -AMS, sendo estes incapazes de se ligar à enzima alvo (Le Berre-Anton [122]).

Segundo Svensson [111], Le Berre-Anton [112] e Koukiekolo [126], o complexo α AI-1/PPA forma-se através de dois sítios activos (representados por dois *loops* na Figura 3) e do mecanismo de inibição não-competitiva.



Figura 3. Complexo entre α AI-1 e PPA (RCSB PDB code 1 DHK); (*) sítio activo da faseolamina (adaptação de Santimone [123]).

Leonor Michaelis e Maude Menten propuseram um modelo simples para a inibição não-competitiva em 1913, onde a ligação entre substrato (S) e o inibidor (I) dá-se em simultâneo com a enzima (E), em vez destes competirem pelo mesmo local de ligação, uma vez que o I liga-se a um local alostérico da E e deixa livre o sítio activo desta (Arnaut [127]). A ligação EI reduz a actividade enzimática, mas não altera a capacidade da ligação ES. Desta forma, a inibição não-competitiva é uma forma de inibição mista onde o inibidor tem igual afinidade para com a E e enzima-substrato (ES) cuja extensão da inibição depende apenas da concentração do inibidor (Koukiekolo [126]). A equação de Michaelis-Menten abaixo representa a velocidade da reacção para a inibição mista não-competitiva:

$$V = \frac{v_{\max} [S]}{k_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{k_r}\right)}$$

onde: V_{max} é a velocidade máxima (saturação) da reacção que representa a concentração máxima do substrato; K_m é a constante de Michaelis que representa a concentração do substrato onde a velocidade da reacção é metade da V_{max} ; k_i é a constante de dissociação do complexo EI e k_i' é a constante de dissociação do complexo ESI. Numa inibição não-competitiva, k_i é igual a k_i' , o valor de V_{max} diminui pelo factor de $(1+[I]/K_i)$, e o valor de K_m mantém-se constante, cujos valores baixos de K_m correspondem a complexos ES fortes. (Arnaut [127]).

A interacção entre o inibidor (α AI-1) e enzima (PPA) realiza-se através de ligações de hidrogénio entre os resíduos catalíticos, ocorrendo a formação lenta dos complexos EI e ESI. O processo de inibição da enzima pela α -AI ocorre exclusivamente quando a enzima (PPA) é incubada juntamente com o inibidor antes de ser adicionado o substrato (amido) com formação do complexo enzima-inibidor (EI) durante a incubação (Santimone [123]). Ao adicionarmos o substrato (S) à reacção pré-incubada de PPA (enzima, E) e α -AI (inibidor, I), o complexo ESI é formado não pela ligação do inibidor ao complexo ES, mas a partir da ligação lenta do inibidor à enzima antes da ligação rápida do substrato ao complexo EI (Koukiekolo [126]). A hipótese de ataque múltiplo do inibidor à PPA parece explicar o comportamento da enzima que permanece ligada após o primeiro ataque por parte do inibidor até surgir uma nova redução da cadeia glicosídica, que altera a sua actividade e liberta as moléculas de maltose antes do complexo enzima-inibidor se dissociar, sendo que este mecanismo ainda não está completamente explicado (Desseaux [117]).

A α AI-1 é conhecida como um bloqueador de amido (oligossacarídeo complexo), e vem sendo aplicada em suplementos dietéticos com o intuito de inibir a acção da α -amilase na hidrólise deste em glucose (monossacarídeo) (Celleno [9]; Boniglia [10]; Obiro [11]). Consequentemente, há diminuição dos açúcares absorvidos pelo organismo ao nível do intestino delgado (tanto no Homem como em animais), conferindo propriedades nutracêuticas, embora limitadas, essencialmente anti-diabéticas e anti-obesidade (Layer [128]; Le Berre-Anton [112]; Celleno [9]; Chokshi [129]; Obiro [11]).

Com a cocção do feijão, os inibidores de proteases, lectinas e faseolaminas são potencialmente inactivados, existindo evidências de que permanecerá ainda alguma actividade residual, não se sabendo ao certo quanto e quais permanecem activos (Sgarbieri [41]). A actividade inibitória da faseolamina sobre a α -amilase pode variar entre os 2,3 (Marzo [104]) e os 9,0 AIU/Kg (Mosca [115]; Boniglia [10]).

2.4. NIRS - Espectroscopia na Região Próxima do Infravermelho

A técnica de Espectroscopia na Região Próxima do Infravermelho (*Near Infra-Red Spectroscopy* – NIRS) foi descoberta em 1881, após a descoberta da radiação na região próxima do Infravermelho (NIR) para além da região do visível, com o registo de espectros de compostos orgânicos que evidenciavam a presença de átomos de hidrogénio na sua estrutura (Workman [130]). Desde então, esta técnica tem vindo a desenvolver-se desde meados de 1912, sendo utilizada na determinação da humidade atmosférica, análise do teor de água em gelatinas (1938), progredindo até aos combustíveis e óleos vegetais (1940) (Burns [131]). Em 1949 a técnica NIRS é aplicada na indústria alimentar por Karl Norris da USDA (*United States Department of Agriculture*), na classificação de ovos (Workman [130]). Em 1962, o NIRS foi utilizado pela primeira vez em aplicações agrícolas por Norris, Hart e Glumbic, com a determinação da humidade em extractos de sementes em metanol, e em 1968 a determinação da humidade e da concentração de proteína em cereais em grão por Ben-Gera & Norris (Burns [131]; Workman [130]). Em 1966, o NIRS foi utilizado na indústria farmacêutica no estudo das ligações de hidrogénio das aminas e amidas, bem como em análises quantitativas destes grupos funcionais em soluções (Workman [130]). Esta técnica tem vindo a ser utilizada na determinação de inúmeros parâmetros em amostras biológicas, desenvolvendo-se numa técnica espectroscópica de alta precisão com cálculos computacionais complexos envolvidos em análises multivariadas (Schimleck [132]). Até à década de sessenta, esta região do espectro electromagnético raramente foi utilizada por se considerar conter informação estrutural irrelevante, como a ausência de picos definidos, sobreposições múltiplas das bandas de absorção e combinações das vibrações moleculares, dificultando a atribuição de bandas (Schimleck [132]). No início dos anos setenta começou-se a determinar o teor proteico em alimentos. Desde então, esta técnica tem progredido de modo a permitir uma análise dos mais variados parâmetros em simultâneo, como a humidade, lípidos, amido e fibra (Burns [131]).

A técnica NIRS, em relação às técnicas de *química molhada*, apresenta inúmeras vantagens ao nível da rapidez, confiança e versatilidade, facilidade na preparação da amostra e multiplicidade de determinações numa única operação com análise não destrutiva, podendo ser aplicada na análise de frutos, vegetais e grãos (Schimleck [132]; Hacisalihoglu [133]). Esta técnica demonstrou ser extremamente importante na área nutritiva, devido ao valor económico dos produtos a ser determinado pelo conteúdo proteico e peso seco, como é o caso do trigo, feijão e grãos. Comparativamente às técnicas de *química molhada*, estas últimas são menos rentáveis devido aos custos elevados, elevada produção de resíduos e sua morosidade (Workman [130]). As previsões da técnica de NIRS são altamente reprodutíveis, apresentando exactidão análoga em relação aos testes analíticos de referência para cada constituinte em análise, sendo esta a sua maior limitação

técnica, depender de métodos referência por vezes menos precisos (Osborne [134]; Hacisalihoglu [133]).

A técnica NIRS insere-se na utilização de um equipamento dispendioso, mas tendo em conta a rapidez de análise e precisão dos resultados obtidos, torna-se extremamente compensatória devido ao facto de não haver dispêndio de tempo e dinheiro associados à utilização de reagentes químicos em cada análise.

2.4.1. Origem do espectro NIR

O espectrofotómetro NIR possui uma fonte policromática que envolve a absorção de frequências específicas das transições moleculares vibracionais (sobreposição e combinação) na amostra (Siesler [134]). A zona espectral corresponde às múltiplas bandas de absorção que se devem principalmente à transição molecular vibracional, resultando em sobreposição e combinação das vibrações de deformação axial ou estiramento (*stretching*) dos grupos funcionais XH_n (O-H, N-H, C-H e S-H), encontrando-se compreendida na zona entre os 1200 e os 2500 nm (Siesler [135]; Schimleck [132]; Hacisalihoglu [133]). Esta é a zona essencial do espectro electromagnético no que respeita à região NIR, por exemplo para material biológico, visto que esta ocupa uma gama que varia entre os 800 e 2500 nm da região do infravermelho ($700-10^6$ nm), como podemos observar na Figura 4 (Siesler [135]; Schimleck [132]). Se esta zona se encontrar abaixo dos 1200 nm, ocorre uma baixa absorção de bandas, dificultando os registos por reflectância, enquanto que a acima dos 2500 nm, as bandas tornam-se demasiado intensas (Schimleck [132]).

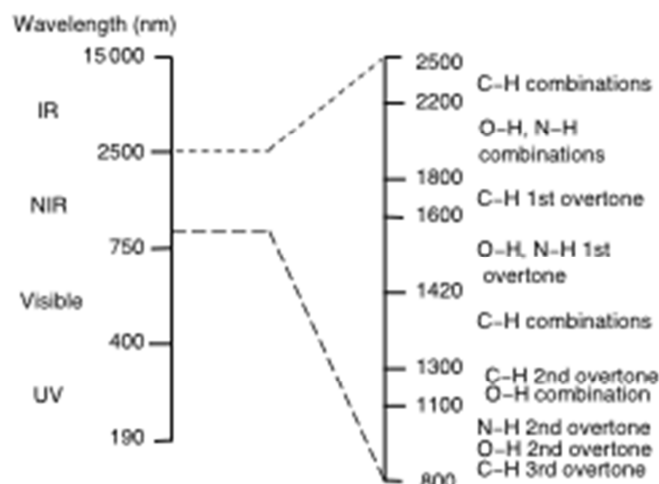


Figura 4. Localização das principais bandas de absorção na região NIR (Osborne [134]).

A sobreposição de bandas no espectro deve-se à anarmonicidade da vibração de estiramento. O movimento de estiramento da molécula faz com que esta se desforme à medida que estica, impedindo-a de regressar à sua posição original. Este movimento

representa 10 a 1000 vezes menos intensidade que uma vibração fundamental (Siesler [135]). Como tal, quanto maior for o desvio da vibração resultante da ligação química entre os átomos de uma molécula, maior será a intensidade das bandas de sobreposição, ou seja, maior será a anarmonicidade das ligações químicas entre um átomo mais leve (Hidrogénio) e um átomo mais pesado (Carbono, Azoto ou Oxigénio) (Osborne [134]; Workman [130]).

A espectroscopia na região NIR utiliza algoritmos de modo a interpretar os dados registados de absorvância das amostras, relacionando a absorvância da amostra (χ) num comprimento de onda específico com a concentração do analito, utilizando a lei de Lambert-Beer:

$$\chi = \varepsilon \times d \times \gamma$$

A diferença entre a transmissão e a reflexão deve-se à diferença do percurso óptico percorrido pela luz. Na região dos 1100 aos 2500 nm, dá-se dispersão do feixe de luz fazendo com que este seja incapaz de penetrar em amostras com mais de 1 cm em modo de transmitância. Deste modo, grande parte da radiação incidente é reflectida, onde estamos perante uma radiação de *reflectância difusa* (R) empiricamente relacionada com a concentração (γ) da substância na amostra. A absorvância χ pode ser descrita pelo $\log(1/R) = k\gamma$, onde k é o factor que incorpora tanto a absorvidade molar (ε) de cada amostra como o percurso óptico da radiação (d), no modo de reflectância (Figura 5) (Osborne [134]). A dispersão da radiação oscila consoante as variações no conteúdo de água, tamanho da partícula e temperatura, fazendo com que quanto maior for a radiação absorvida, consequentemente maior serão os valores de $\log(1/R)$ (Berzaghi [136]).

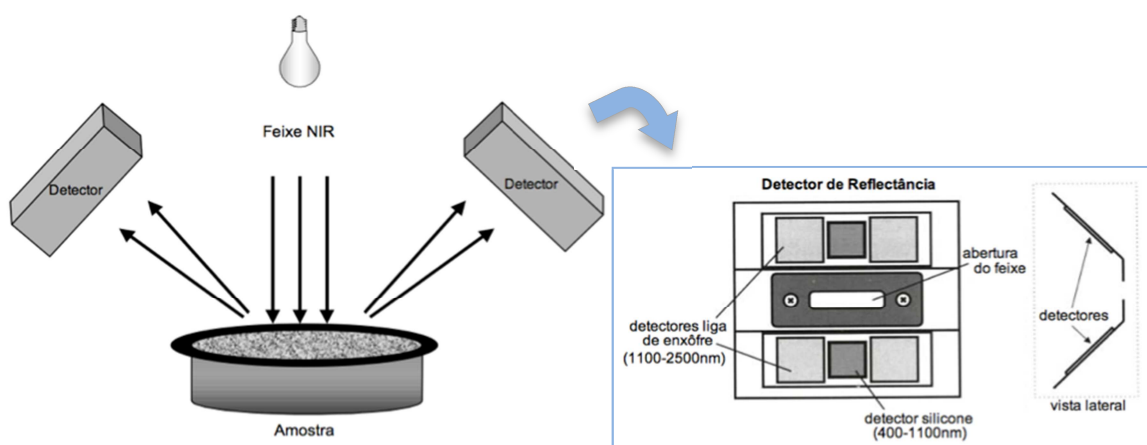


Figura 5. Análise de uma amostra de farinha em Reflectância Difusa (adaptação de Osborne [134]).

A complexidade dos constituintes orgânicos dos alimentos e amostras biológicas conduz a picos de absorvância largos, havendo necessidade de recorrer à quimiometria por regressões lineares multivariadas (MLR) de modo a calibrar o espectro NIR, relativamente à composição química, evidenciando uma maior complexidade nos espectros obtidos no NIR em relação ao IR (Infravermelho) (Osborne [134]; Hacısalihoglu [133]).

2.4.2. Quimiometria

A quimiometria é uma aproximação matemática aplicada às ciências químicas de modo a desenvolver um modelo que defina a média e o desvio padrão de cada tipo de amostra em estudo num espaço multidimensional, de modo a testar e identificar posteriormente o grupo a que uma amostra desconhecida pertence (Osborne [134]). O pré-tratamento espectral, o aperfeiçoamento dos métodos quantitativos e qualitativos a utilizar, a selecção de amostras para o conjunto de calibração e validação com exclusão de *outliers* são procedimentos efectuados à base de quimiometria para robustez do modelo de calibração (Siesler [135]). O desenvolvimento dos modelos de calibração no NIRS baseia-se em quatro passos de calibração:

- análise das amostras de calibração a partir de valores de referência de modo à obtenção de valores para cada parâmetro da amostra;
- obtenção do espectro NIR correspondente a cada calibração da amostra;
- determinação do modelo matemático entre os espectros NIR e valores de referência correspondentes para cada parâmetro;
- validação da calibração com amostras independentes de modo a envolver ambas as técnicas de referência e NIRS, permitindo verificar se ambas estão estatisticamente correlacionadas (Burns [131]).

O desenvolvimento de um modelo de calibração depende da complexidade dos espectros criados no NIRS, havendo a necessidade de recorrer a uma série de correcções à base algoritmos para redução da complexidade do modelo de calibração, tornando-o mais linear para uma interpretação simplificada (Siesler [135]). De seguida serão abordados cada um dos procedimentos e métodos utilizados na obtenção dos dados pela técnica de NIRS através de pré-tratamentos e de análise multivariada.

2.4.2.1. Pré-tratamento espectral

Na prática, o pré-tratamento facilita o processo de calibração reduzindo, eliminando ou padronizando as variações e oscilações espectrais provenientes da dispersão da luz da amostra e das interações intermoleculares entre componentes, adicionando a distorção

espectral procedente do *hardware* do espectrómetro, desde efeitos da não-linearidade e ruídos do detector, difusão da luz e modificação dos comprimentos de onda (Siesler [135]).

O pré-tratamento consiste na redução de potenciais interferentes como o tamanho das partículas (por Correção de Difusão Multiplicativa ou Variação de Padrão Normal), ruído (*smooth*), linha de base (*detrend*) e melhoria da definição de picos sobrepostos (por sistema de derivadas), de modo a não influenciar a informação espectral necessária para a realização da análise preditiva da amostra (Siesler [135]).

2.4.2.1.1. Correção de Difusão Multiplicativa

O método de correção de difusão multiplicativa (*Multiplicative Scatter Correction – MSC*) permite a simplificação do modelo de calibração através de correções ao nível da dispersão da luz. Este método é o mais utilizado na normalização das leituras de reflectância difusa com múltiplas variações espectrais causadas pela dispersão da luz em amostras sólidas ou emulsões, com indução de um determinado erro amostral. O MSC cria um espectro alvo através da média dos pontos do conjunto de calibração, expresso como a soma da diferença dos quadrados, entre os dados do espectro transformado e o espectro alvo, o que permite a utilização de uma regressão linear para estimar os parâmetros do espectro a ser corrigido. Desta forma aumenta a linearidade simplificando o modelo matemático, embora a aplicação deste método implique a escolha do espectro alvo mais apropriado que represente correctamente a composição da amostra (Siesler [135]; Nicolai [137]).

2.4.2.1.2. Variação de Padrão Normal

A variação do padrão normal (*Standard Normal Variate – SNV*) melhora a precisão dos resultados minimizando o erro amostral relativo à diferença de densidade e tamanho das partículas da amostra. Desta forma, este algoritmo de normalização assemelha-se ao modelo MSC, mas não permite simplificações do modelo matemático nem redução significativa das interferências sistemáticas. O SNV centra cada espectro em torno de zero por subtração da média, com posterior divisão de cada sinal pelo desvio padrão de todo o espectro, sem requerer uma informação adicional quanto ao produto analisado (Siesler [135]).

2.4.2.1.3. Derivadas

A derivação transforma o espectro NIR com o intuito de remoção de oscilações na linha de base e picos sobrepostos no espectro, permitindo melhorar a resolução dos picos

originais, demonstrando maior eficácia na eliminação de efeitos aditivos e dos interferentes relativos ao diâmetro das partículas em relação às técnicas SNV e MSC (Nicolai [137]). Um exemplo de sobreposição de picos encontra-se ilustrado na figura 6, com representação de espectros sintéticos, mostra-nos a melhoria de resolução e correcta interpretação espectral.

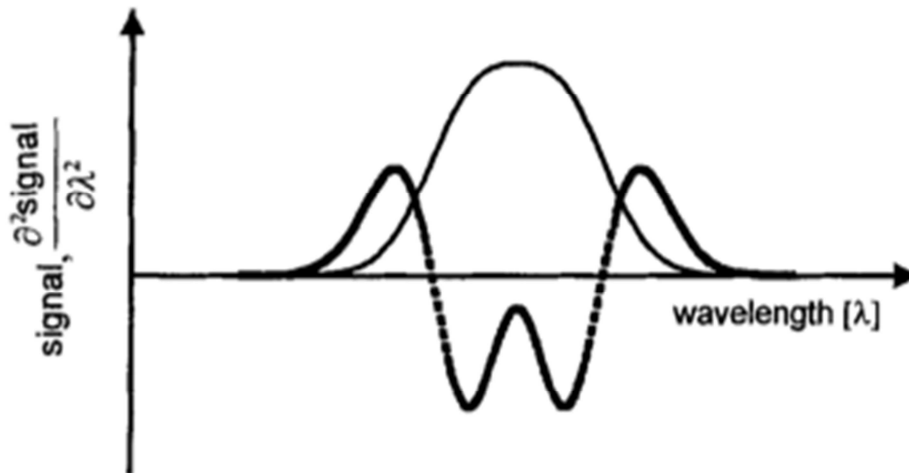


Figura 6. Melhoria na definição espectral através de derivadas: linha sólida representa o sinal original composto por dois picos de curvas Gausseanas sobrepostos, e a tracejado encontra-se a segunda derivada do sinal original (Siesler [135]).

De um modo geral, a primeira derivada é a mais utilizada para esse efeito, salientando de uma forma mais clara os sinais menos proeminentes no espectro em relação aos de maior intensidade, por amplificação do ruído espectral. A segunda derivada só deverá ser aplicada em regiões restritas, devido à grande intensidade do ruído espectral que se forma, sendo necessária a utilização de alguns filtros para alisamento (*smoothing*) dos picos (Osborne [134]; Siesler [135]).

Cada derivada remodela o espectro com a transformação linear em termos constantes, onde a segunda derivada tem a capacidade de transformação dos picos máximos em mínimos e vice-versa.

As derivadas de primeira e segunda ordem são as mais indicadas para previsão pelo modelo PLS (Siesler [135]). O tratamento matemático aplicado às derivadas é-nos dado através de pontos para o cálculo da derivada e alisamento dos picos, sendo mais comumente utilizado o (1, 4, 4, 1), representado pelo sistema (*a, b, c, d*), onde *a* é a ordem da derivada, *b* é o número de pontos no segmento para calcular a derivada (*gap*), *c* é o segmento de alisamento (*smooth*) dos picos e *d* é o segundo alisamento dos picos (Fernández-Ahumada [138]).

2.4.2.2. Análise Multivariada

O modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares* - PLS) e o modelo por regressão por componentes principais (*Principal Component Regression* - PCR) são algoritmos de regressão quantitativos utilizados para dados lineares (Williams [139]).

O PLS é usado para obter equações de calibração, indicado para a calibração de amostras complexas e com baixo sinal de interferência entre o analito e as características do espectro. Ao contrário do PCR, o PLS inclui toda a informação durante os cálculos ao considerar os valores laboratoriais. Ambos os algoritmos detectam interferentes (*outliers*) na amostragem global (Burns [131]; Siesler [135]). Os *outliers* são definidos como amostras que apresentam diferenças significativas entre os valores de referência e os previstos pela técnica NIRS (*outliers* T, com $T > 2,5$ pelo teste *t-student*) e distância de Mahalanobis (H) elevada ($H > 3$) com desvio relativamente ao centro espectral do conjunto de calibração (*outliers* H) (Gillon [140]).

A desvantagem do PCR centra-se na forma como as variáveis latentes (ou componentes principais) são ordenadas, de acordo com a variância espectral, onde os primeiros componentes principais que são usados para o modelo de regressão não são os mais elucidativos para a calibração (Nicolai [137]). O PLS foi introduzido como alternativa à PCR, por basear-se num número mínimo de variáveis latentes a utilizar para a previsão, ordenando-as de acordo com a sua relevância, simplificando o modelo ao número mínimo de variáveis latentes, tendo em conta as variáveis com informação mútua, como é o caso de dados obtidos a partir de espectros de material biológico, onde se verifica uma alta correlação entre estas (Nicolai [137]).

O PLS apresenta maior robustez, simplicidade e capacidade de previsão que o modelo por PCR, quando o número de termos é semelhante, isto é, quando o número ideal de factores para os diferentes constituintes minimiza o erro total entre os valores modelados e de referência (erro padrão da validação cruzada – SECV) é o mesmo (Burns [131]; Siesler [135]). Porém um modelo modificado de regressão por mínimos quadrados parciais, designado de MPLS, é frequentemente mais estável e preciso do que o algoritmo padrão.

Um outro modelo, a rede Neuronal Artificial (*Artificial Neural Network* – ANN) também tem vindo a ser utilizado como modelo de calibração para dados espectrais não-lineares (Nicolai [137]; Williams [139]). A ANN, é constituída por redes neuronais provenientes de cálculos por dispositivos computacionais, torna-se menos acessível do que as técnicas lineares, por ser aplicada a uma base de dados extremamente robusta (mínimo 2000 amostras), por ser de difícil compreensão e apresentar maior dificuldade na visualização e interpretação dos resultados (Nicolai [137]; Williams [139]).

A técnica de NIRS é uma técnica linear, sendo os modelos lineares à base de algoritmos os mais indicados para esta técnica, por fornecerem aproximações lineares por variáveis latentes para a previsão (Nicolai [137]).

2.4.3. Testes Estatísticos

O modelo calibrado para os parâmetros em análise permite relacionar os espectros das amostras com os valores de referência obtidos em laboratório, através do varrimento de novas amostras, que utiliza a calibração como referência da previsão. O desempenho dos modelos de calibração é submetido a um processo de validação, juntamente com o processo de previsão. Esta validação consiste primeiramente na avaliação das diferenças espectrais entre os passos de calibração e previsão, seguido do cálculo dos parâmetros padrão de modo a corrigir as diferenças estimadas (Burns [131]). O processo de validação pode ser variado. Geralmente os dados são divididos em dois subconjuntos, de modo a tornar o modelo mais robusto a variações do sistema, operador, condições ambientais, temperatura da amostra: um subgrupo correspondente às amostras usadas na calibração e outro subgrupo de amostras utilizadas na validação (validação externa). Utiliza-se a validação cruzada para a determinação do modelo e número ideal de factores utilizados na calibração, enquanto a validação externa geralmente é utilizada para aumentar a robustez do modelo aplicado (Siesler [135]).

Quando o número de dados é limitado, recorre-se frequentemente à validação cruzada por *leave-one-out* relativamente às amostras utilizadas na calibração. Numa série de amostras utilizadas na calibração, é deixada sempre uma nova amostra de parte até todas as amostras terem sido excluídas pelo menos uma vez. Assim, realiza-se a previsão da concentração da amostra que não foi usada na calibração, de cada vez que uma nova amostra é retirada do conjunto de calibração. O modelo que prevalece será aquele que apresenta um menor erro de validação RMSECV (*Root Mean Squared Error of Cross Validation*) ou, mais conhecido como SECV (*Standard Error of Cross-Validation*) (Siesler [135]). A validação externa requer o uso de amostras independentes, isto é, desconhecidas relativamente ao grupo de calibração, sendo utilizada quando o modelo deste é suficientemente robusto (Burns [131]). A qualidade da calibração, previsão e validação é determinada principalmente através de testes estatísticos padrão:

- Erro padrão da calibração (SEC) é útil para a selecção de um conjunto específico de comprimentos de onda a usar no desenvolvimento de uma equação de calibração. O SEC é o desvio padrão dos resíduos obtidos pela diferença entre os valores de referência (de bancada) e os valores previstos pelo NIRS a partir da série de dados da calibração (Burns [131]).

- Erro padrão da previsão (SEP) é-nos dado através da variabilidade na diferença entre os valores previstos e os de referência quando aplicada uma equação em específico à série de dados de validação, isto é, às amostras que se encontram fora do conjunto de calibração (Burns [131]). Em algumas publicações o SEP é reportado ao invés do RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*) (Nicolai [137])
- Erro padrão da validação cruzada (SECV) é um algoritmo de repetição, que se baseia na variabilidade registada entre a diferença de valores previstos e de referência quando aplicada uma equação a um subconjunto de dados do conjunto de calibração. O SECV geralmente é utilizado em várias equações, onde aquela equação que apresentar o valor mais baixo de SECV é seleccionada como melhor calibração (Burns [131]).
- O coeficiente de correlação ou de determinação múltiplo (R^2) permite determinar a proporção da variabilidade nos dados de referência a partir da equação de regressão. Quanto maior for a sua aproximação a uma unidade, maior será a capacidade de modelação dos dados dos modelos de calibração (Burns [131]).
- A Bias, definida como a diferença entre os valores médios previstos e os de referência, permite o cálculo de variações sistemáticas de erros na previsão e calibração através do erro padrão corrigido pela Bias para a previsão e calibração, ou seja, SEP(C) e SEC(C), respectivamente (Burns [131]; Siesler [135]).

Não existe uma regra absoluta que determine o número mínimo ou máximo de amostras para calibração, dependendo do método padrão utilizado e da complexidade dos espectros. O uso de modelos de calibração muito robustos, constituídos por centenas a milhares de dados, é utilizado para prever as várias alterações que se poderão verificar ao nível da amostra, o que poderá levar a um longo período de análise, requerendo um esforço considerável além de custos elevados e atrasos. O modelo robusto apenas o é para um tipo de variação específico onde, por exemplo, uma correcção do sinal multiplicativo pode eliminar as diferenças entre espectros resultantes do tamanho da partícula, mas é incapaz de corrigir diferenças mais complexas, como é o caso da variação da temperatura (Burns [131]).

A complexidade do modelo espectral aumenta à medida que as amostras divergem quanto às características químicas em comum. Porém, esta amostragem terá de ser representativa quanto ao tipo de material, com uma vasta gama de valores de referência (Burns [131]). Na prática, a exactidão está correlacionada com a robustez do modelo, visto que restringe-se à variação espectral para obtenção de uma equação de calibração mais

exacta, tendo em conta a variabilidade espectral de modo a obter uma equação com variabilidade espectral estendida e aplicá-la a material espectralmente diverso (Gillon [140]).

Na análise da semente de feijão, as calibrações e posteriores previsões foram efectuadas utilizando farinha fina, obtida com recurso a moinho. Hermida [141] utilizou farinha na determinação de humidade, amido, proteína e lípidos, enquanto que Hacisalihoglu [133] efectuou previsão do teor de proteína, amido e peso em sementes intactas, sem recorrer à alteração física da amostra.

3. Material e Métodos

Neste estudo foram utilizadas amostras de germoplasma de variedades regionais de feijão, provenientes da colecção do ISOplexis, cuja prospecção e recolha foi efectuada junto dos produtores e posteriormente multiplicadas sob as mesmas condições ambientais, no campo de ensaios (localização 32°39'52" N, 16°55'44" W a 159 m de altitude) da Universidade da Madeira. Utilizou-se 27 acessos de feijão, dos quais 20 provieram dos ensaios agronómicos de 50 acessos representativos da diversidade de feijões madeirenses, com o objectivo de identificar as variedades regionais, e restantes 5 são cultivares padrão e 2 cultivares comerciais (*feijão Catarino* e *feijão Preto*) (Tabela I). Os padrões de feijão provieram do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) da Galiza, e os comerciais de um supermercado local.

Dos 20 acessos de feijão regional, 17 foram seleccionados por serem as amostras mais próximas dos centróides de cada cluster varietal identificado no estudo de caracterização morfológica dos recursos genéticos de feijão comum da região (Freitas [33]). Os clusters e agrupamentos obtidos a partir desse estudo separam-se quanto ao tipo de crescimento (determinado - feijões anões e indeterminado - feijões de trepar) e por um conjunto de caracteres morfo-agronómicos.

3.1. Preparação das farinhas

As sementes das amostras sofreram um processo de desidratação em sílica-gel até possuírem uma humidade relativa inferior a 8%, de acordo com as normas de IPGRI/Biodiversity International (Hong [142]), de modo a garantir a sua preservação no banco de germoplasma (Rao [143]).

Na preparação da amostra para análise, retirou-se o tegumento e o embrião de 50 sementes com auxílio de um bisturi, triturou-se os cotilédones recorrendo a um moinho de café e macerou-se num almofariz até à obtenção de farinha com granulação fina (200 mesh – 74µm).

A farinha foi acondicionada em tubos hermeticamente fechados, abrigados da luz e à temperatura ambiente, até à realização das análises.

Tabela I. Lista dos acessos (ISOPs) de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizados no estudo.

ISOP	Nome Vernacular	Tipo crescimento	Local de recolha	Origem
00460	Vergalheiro	Trepador	Santana	Regional
00478	Filipe	Trepador	Santana	
00480	Preto	Trepador	Santana	
00505	Corno de Carneiro	Trepador	Santana	
00508	Milheiro	Trepador	Santana	
00534	Vaginha	Trepador	Santana	
00670	Branco Rasteiro	Rasteiro	S. Vicente	
00712	Vaginha	Trepador	S. Vicente	
00713	Vaginha Grossa	Trepador	S. Vicente	
00722	Açores	Trepador	S. Vicente	
00724	Vermelho	Trepador	S. Vicente	
00726	Vassoura Rasteiro	Rasteiro	S. Vicente	
00731	Rasteiro (Vassoura)	Rasteiro	Rib. Brava	
00743	Feijão	Rasteiro	S. Vicente	
00755	Valinho	Trepador	Porto Moniz	
00757	Feijão	Trepador	Porto Moniz	
00798*	Riscado de Vara	Trepador	Calheta	
00828	Amarelo	Trepador	S. Vicente	
00980*	Barbinha	Trepador	Santa Cruz	
01944*	Manteiga ou Meia Lua	Trepador	Faial	
00876	Contender MBG CODE: PHA-0947 PI CODE: PI-474218	Rasteiro	Galiza	Padrão
00877	Sanilac MBG CODE: PHA-0948 PI CODE: PI-549695	Trepador	Galiza	
00878	Tendergreen MBG CODE: PHA-0949 PI CODE: PI-549633	Rasteiro	Galiza	
00879	Pampa MBG CODE: PHA-0950 PI CODE: PI-306156	Rasteiro	Galiza	
00880	Boyaca MBG CODE: PHA-0951 PI CODE: PI-306156	Rasteiro	Galiza	
-	Catarino	Rasteiro	-	Comercial
-	Preto	Rasteiro	-	

* Nota: ISOPs utilizados apenas como meio de validação da técnica NIRS, não fazendo parte do grupo de centróides regionais previamente estabelecidos, com contribuição independente para a base estatística.

3.2- Composição centesimal por método convencional

A análise da composição centesimal foi efectuada em triplicado para todos os parâmetros analisados no presente estudo.

3.2.1. Humidade relativa

A humidade das farinhas foi determinada utilizando um medidor de humidade Kern (MRS 120-3), através da desidratação de 1 g de peso fresco de amostra (PF) a uma temperatura situada entre os 100 e 105°C, até à obtenção de um peso constante (RS - Resíduo Seco) (AOAC 925.10 [144]).

Na equação abaixo, o teor de humidade é expresso em matéria seca (MS), cuja percentagem obtida de perda de peso foi expressa em g/100g de MS (Rao [143]; AOAC 925.10 [144]),

$$\%MS = (PF-RS/RS)*100$$

onde: PF é o peso fresco da farinha de feijão; RS é o resíduo seco, ou seja, peso da farinha de feijão desidratada.

3.2.2. Cinzas

As cinzas foram obtidas por incineração de 1 g de amostra em cadinhos de porcelana (30ml) calcinados à temperatura de 550±10°C num forno Mufla Vulcan (3-550), durante 5 horas. Arrefeceu-se os cadinhos num exsiccador até à temperatura ambiente e determinou-se gravimetricamente a quantidade de resíduo obtido numa balança analítica Sartorius (RC 210 P). Os resultados foram expressos em g/100g MS (NP 518:1986 [145]).

3.2.3. Lípidos

A extracção da fracção lipídica da amostra foi realizada após a solubilização do amido presente em 200 mg de amostra, através do método de Humphreys [146], utilizando ácido perclórico a 7M. O teor de lípidos presente nas farinhas de feijão foi determinado pelo método gravimétrico de Bligh [97], após a sua extracção numa solução de MeOH:CHCl₃:H₂O na proporção de 2:1:1 (V/V/V), respectivamente, com evaporação do clorofórmio numa estufa a 35°C durante 48h. Os resultados obtidos foram expressos em g/100g MS.

3.2.4. Açúcares solúveis totais

Os açúcares solúveis foram extraídos de 100 mg de farinha de feijão, com etanol a 80%, e quantificados pelo método proposto por McCready [147], com adaptações segundo Bailey [89], fazendo reagir os açúcares com uma solução de Antrona a 0,02% (em ácido sulfúrico a 70%). Os extractos foram incubados em banho-maria (100°C, durante 7min), de modo a provocar a ruptura das ligações glicosídicas e desidratação dos monómeros de glicose, com produção de derivados furfurais. Estes derivados, ao reagirem com a solução de Antrona, produzem uma coloração azul-esverdeada, cuja intensidade é determinada no espectrofotómetro UV/Vis (2401 PC, Shimadzu) a 620nm, com software UVProbe. A quantidade de açúcares solúveis na amostra de feijão foi determinada usando uma recta de calibração de glucose (dos 0 aos 100µg/ml) e expressa em g/100g MS.

3.2.5. Amido

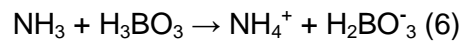
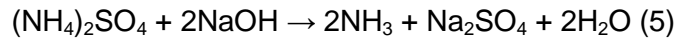
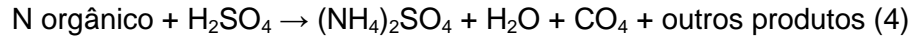
Após a extracção dos açúcares solúveis de 15 mg de amostra com solução etanólica a 80%, procede-se à extracção ácida do amido, adicionando-se HCl a 1,1% ao resíduo obtido por centrifugação, com posterior incubação em banho-maria (100°C, durante 30min). O amido é desta forma hidrolisado em glucose no meio ácido e na presença de calor, onde os monómeros de glucose são desidratados e convertidos em compostos hidroximetil furfural. A antrona preparada em ácido sulfúrico (72%) foi adicionada ao extracto, numa proporção de 1:5 (V/V), e incubou-se a mistura novamente em banho-maria a 100°C durante 11min, com obtenção de um produto com coloração esverdeada, produto da reacção da antrona com os furfurais presentes na amostra. O doseamento foi efectuado no espectrofotómetro UV/Vis (2401 PC, Shimadzu) a 630nm com software UVProbe, tendo por base a recta de calibração de amido (0 a 10mg/10ml). O método aplicado foi de Hodge [148], com os resultados expressos sob a forma de g/100g MS.

3.2.6. Proteína bruta

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl AOAC 945.18-B [149], digerindo primeiramente 1 g de amostra a 420°C no digestor Velp Scientifica DK 8S Heating Digester, juntamente com catalisador (sulfato de potássio e selénio), ácido sulfúrico a 96% e peróxido de hidrogénio a 35%.

No decorrer da digestão, o azoto presente na matéria orgânica reage com o ácido sulfúrico, libertando carbono sob a forma de CO₂ e o hidrogénio sob a forma de água (4). O azoto orgânico é fixado sob a forma de sulfato de amónia que, durante a destilação, é neutralizado pela adição de base em excesso (NaOH) de modo a converter NH₄ em NH₃ (5),

sendo posteriormente condensada num frasco com solução de ácido bórico e indicadores colorimétricos (verde de bromocresol e vermelho de metilo) para ser titulado com uma solução de HCl (0,2N) e quantificado (6), no aparelho de destilação e titulação da Velp Scientifica UDK 152 (Corporation [150]).



A concentração de proteína bruta foi expressa em g/100g MS, após a conversão de azoto presente na farinha multiplicando-o pelo factor 6,25.

3.2.7. Minerais

O conteúdo de minerais foi determinado no laboratório de Análises de Solos e Plantas (DRADR/DSLAA, Camacha).

3.2.6.1- Determinação Azoto

O azoto foi determinado por digestão em ácido sulfúrico, com detecção/quantificação por colorimetria (Skalar Sanplus System). Os resultados foram expressos em g/100g MS (Temminghoff [151]).

3.2.6.2- Determinação do Fósforo e Boro

As cinzas, obtidas num forno Furnace Termolyne Type 48000, foram solubilizadas em ácido clorídrico para o Fósforo, ou ácido sulfúrico tratando-se do Boro, com posterior detecção/quantificação por colorimetria (Skalar Sanplus System). Os resultados foram apresentados sob a forma de g/100g MS (Temminghoff [151]).

3.2.6.4- Determinação do Cálcio, Magnésio, Ferro, Cobre, Zinco, Manganês e Potássio

Solubilização das cinzas em ácido clorídrico com posterior detecção/quantificação por Espectroscopia de Absorção Atómica (Perkin Elmer Instruments, AAnalyst 800). Os resultados foram apresentados sob a forma de g/100g MS (Temminghoff [151]).

3.3. Composição centesimal por NIRS

Os espectros dos parâmetros de composição centesimal (Resíduo Seco, Proteína, Lípidos, Açúcares solúveis, Amido, Cinzas e Minerais) foram determinados no FOSS NIRSystems 5000. O aparelho operou em modo de reflectância num intervalo espectral de 1100-2500 nm, com leitura de dados a cada 2 nm para a criação de espectros com 700 pontos. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. A análise das farinhas foi efectuada recorrendo ao software WINISI II, versão 1.5, com registo dos valores de absorvância como $\log 1/R$, onde R é a reflectância da amostra. Após obtenção dos espectros NIR, efectuou-se o pré-tratamento espectral baseado na correcção por SNV, MSC e por *detrend* na criação de modelos por regressão PLS e MPLS, usando a 1ª derivada do espectro e o número de factores utilizados por esta técnica para calibração do modelo. O desempenho das diferentes calibrações foi avaliado por SEC (com valor de T (*cross validation residuals*) fixo a 2,5 e valor de H fixo a 10,0), SECV e R^2 para o conjunto de calibração. No conjunto de validação usou-se o SEP, R^2 e Bias.

3.4. Faseolamina (inibição da PPA)

A actividade catalítica da α -amilase (Amilase Pancreática Suína Tipo I-A, 27mg proteína/ml, 1325 U/mg, Sigma), ou da PPA, foi determinada na presença e ausência de extracto de feijão. Os resultados foram utilizados para determinar a presença e a actividade inibitória da faseolamina nos extractos de feijão. A α -AMS ou PPA hidrolisa o amido em açúcares redutores, essencialmente a maltose. A quantidade de maltose libertada depende da concentração de enzima na amostra.



Uma recta padrão da maltose foi construída e, utilizada para proceder ao calculo da actividade da α -AMS, considerando uma unidade de actividade catalítica a quantidade de enzima necessária para promover a libertação de 1 μmol de grupos redutores (calculados como maltose)/min a partir do amido solúvel, à temperatura de 37°C, pH 7,0 e na ausência de inibidores.

O extracto de feijão foi obtido a partir de 1g de amostra em farinha dissolvida em 10ml de água destilada, durante 12h a 4°C, sob agitação magnética com posterior centrifugação a 7000 rpm para separação do sobrenadante (Makkar [152]). A acção inibidora do extracto sobre a actividade da α -AMS foi determinada pela variação na formação do complexo entre a maltose e o ácido 3,5-dinitrosalicílico, usando 0,50 ml de amido solúvel a 1% como substrato (Bernfeld [153]; Makkar [152]). A maltose produzida pela

acção da α -AMS, reage com o ácido 3,5-dinitrosalicílico reduzindo-o o ácido nitroaminosalicílico, produto com uma coloração castanho-alaranjada.

O extracto de semente de feijão foi avaliado quanto à sua capacidade de inibitória sobre a α -AMS, pela diferença entre a actividade da enzima na ausência (controle da enzima) e presença do inibidor (teste de inibição com extracto), após 30 min de incubação à temperatura de 37°C. Dois brancos foram utilizados: um com extracto na ausência da enzima (branco de inibição) para despiste da actividade das amilases endógenas do extracto; e outro apenas com tampão fosfato (0,2 M) (branco da enzima), para subtrair às leituras a cor residual da mistura reagente (Makkar [152]). A percentagem de inibição foi calculada, através da fórmula,

$$I = \frac{100 - (Ti - Bi)}{Ce - Be} \times 100$$

onde Ti é o teste de inibição (0,25 ml tampão fosfato (0,2 M) + 0,25 ml PPA + 0,25 ml extracto de feijão); Bi é o branco de inibição (0,25 ml tampão fosfato (0,2 M) + 0,25 ml extracto de feijão); Ce é o controle da enzima (0,25 ml tampão fosfato (0,2 M) + 0,25 ml PPA) e Be é o branco da enzima (0,25 ml tampão fosfato (0,2 M)).

Na modelação da actividade da PPA, variou-se a concentração de amido e a quantidade de extracto de feijão, com porção de PPA constante (0,25 ml) em quatro conjuntos de teste de inibição (Ti):

Ti (1): S01 I01, S01 I02, S01 I03

Ti (2): S03 I01, S03 I02, S03 I03

Ti (3): S06 I01, S06 I02, S06 I03

Estes testes foram incubados a 37°C, durante 30 min três conjuntos de testes de inibição (Ti) cada, com o volume respectivamente de 0,10 (I01), 0,20 (I02) e 0,30 (I03) de extracto de feijão, e um branco de enzima (Be). Após 30 min incubação do Ti e Be adicionou-se 0,5 ml de amido a 0,292 mM para o Be e 0,1 mM (S01), 0,3 mM (S03) e 0,6 mM (S06) a cada conjunto de inibição (Ti) e deixou-se reagir, durante 30 min. Adicionou-se 2ml de DNSC, incubou-se em banho-maria a 100°C, durante 10 min e arrefeceu-se num banho de gelo, durante 5 min. Adicionou-se 10 ml de água destilada e determinou-se a absorvância da mistura reagente, contra o Be , nos 540 nm, tendo por base a recta de calibração da maltose (0 a 0,100 mg/ml).

A solução enzimática de PPA foi preparada diariamente em tampão fosfato (0,2 M; pH = 7,0) e pré-incubada, durante 3 min à temperatura de 37°C, antes do início da experiência.

Todos os ensaios (Ti , Bi , Ce e Be) foram realizados em duplicado para o cálculo da inibição expressa em “percentagem média de inibição” \pm “desvio padrão dos resultados para Ti ”.

3.5. Tratamento e análise estatística dos resultados

Na análise dos dados obtidos em laboratório para todos os parâmetros em estudo, recorreu-se a testes estatísticos calculados a partir de programas IBM SPSS Statistics (*Statistical Package for the Social Science*) versão 19.0 for Windows, MVSP (*Multi-Variate Statistical Package*) versão 3.1 for Windows e SigmaPlot versão 11.0 for Windows.

As análises descritivas para cada parâmetro e respectivas amostras foram calculadas, testando-se a linearidade relativamente aos dados através do teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov. Utilizou-se One-Way Anova com testes F para a análise de variância e Tukey HSD para análise de médias ao nível de significância de 5% de probabilidade, bem como correlações por Pearson para detectar a existência de associações entre as variáveis analisadas. A análise multivariada por PCA (*Principal Components Analysis*) foi realizada para determinar a disposição espacial das amostras e detectar a existência de *clusters*, utilizando *Kaiser's rule* e transformação logarítmica log e. A análise discriminante por SPSS foi utilizada para avaliar os grupos obtidos, utilizando o coeficiente de Fisher, a distância de Mahalanobis, a identificação *leave-one-out* e funções Wilks' lambda, para avaliação da significância da função discriminante.

Para a análise estatística dos dados obtidos por previsão pela técnica NIRS, foram utilizados testes do *software* WinISI II v1.5 do equipamento FOSS NIRSystems 5000.

A análise cinética foi abordada pelo programa SigmaPlot v.11 com extensão em farmacologia para a construção de gráficos lineares na determinação do tipo de inibição presente, através da criação de modelos de inibição Michaelis-Menten pelo módulo de Cinética Enzimática.

4. Resultados e Discussão

O principal objectivo deste trabalho consistiu na avaliação nutricional dos recursos genéticos de 17 variedades regionais de feijão comum. Para tal, um total de 24 acessos foi avaliado, dos quais 17 foram seleccionados por serem os centróides das variedades regionais, previamente identificadas por Freitas [33], 5 cultivares padrão provenientes da Galiza e 2 comerciais. Utilizou-se 3 acessos adicionais (00798, 00980 e 01944) para validação na técnica de NIRS, com contribuição independente para a base estatística, perfazendo-se um total de 27 acessos em estudo (Tabela I).

Para uma maior facilidade da leitura, os resultados e a discussão encontram-se divididos em quatro partes, iniciando-se com a abordagem dos resultados das propriedades nutricionais do feijão (resíduo seco, proteína bruta, lípidos, açúcares solúveis, amido, cinzas e minerais) obtidos pelas técnicas analíticas convencionais de *química molhada*, seguindo-se como segunda fase análise e discussão dos resultados da previsão dos parâmetros nutritivos obtidos pela técnica NIRS, comparando-se os resultados desta técnica com as técnicas convencionais utilizadas. Numa terceira fase insere-se o estudo da faseolamina como parâmetro bioquímico anti-nutricional, finalizando-se com análise estatística dos resultados por comparação múltipla e análise de variância dos parâmetros nutricionais e anti-nutricionais.

4.1. Propriedades nutricionais da semente do feijão comum

O estudo das propriedades nutricionais de feijão (proteína bruta, lípidos, açúcares solúveis, amido, cinzas e minerais) refere-se aos dados obtidos pelas técnicas analíticas convencionais por *química molhada*.

4.1.1. Variação dos parâmetros nutricionais nas sementes de feijão comum

Os parâmetros nutricionais são obtidos pela primeira vez para variedades regionais de feijão comum, uma das mais importantes culturas hortícolas da RAM. Os dados obtidos, seguidamente apresentados, referem-se às técnicas analíticas convencionais por *química molhada*, cujos teores encontram-se representados em peso por 100 gramas de matéria seca, ou seja, em g/100g MS ou mg/100g MS.

O estudo das propriedades nutricionais foi realizado através da análise dos teores de resíduo seco, proteína bruta, lípidos, açúcares solúveis, amido, cinzas e minerais dos 24 acessos de feijão e do conjunto de validação NIRS (Tabela I). O conjunto de validação é representado por 3 acessos regionais, de regenerações distintas, sendo desta forma independente do grupo dos 17 acessos regionais em estudo. Este conjunto actua apenas

como um elemento de avaliação da construção do modelo de calibração por PLS na técnica NIRS (ponto 4.2.), como amostras externas ao sistema, com contribuição independente para a base estatística. Na Tabela II, encontram-se os valores médios essencialmente referentes à composição centesimal individual dos 24 ISOPs em estudo e conjunto de validação no NIRS, determinados por *química molhada*.

Tabela II. Valores médios dos ISOPs por parâmetro determinados por *química molhada* (g/100g MS).

ISOP	Parâmetro						
	Açúcares solúveis	Amido	Cinzas	Lípidos totais	Proteína bruta	Resíduo Seco	
Regionais	00460	3,73 ± 0,08	37,22 ± 1,98	4,74 ± 0,16	2,32 ± 0,60	27,21 ± 0,07	90,84 ± 0,82
	00478	3,11 ± 0,03	42,71 ± 0,18	4,61 ± 0,01	2,07 ± 0,19	24,41 ± 0,16	90,13 ± 3,57
	00480	4,02 ± 0,02	37,83 ± 3,56	5,32 ± 0,02	2,86 ± 0,09	20,13 ± 0,04	91,68 ± 1,44
	00505	4,45 ± 0,03	37,39 ± 3,76	5,36 ± 0,05	2,34 ± 0,34	24,02 ± 0,06	91,55 ± 0,40
	00508	3,82 ± 0,07	39,95 ± 1,47	4,65 ± 0,00	2,42 ± 0,08	21,57 ± 0,03	89,19 ± 0,21
	00534	3,59 ± 0,04	42,67 ± 1,46	4,61 ± 0,02	1,61 ± 0,10	20,04 ± 0,28	89,60 ± 2,45
	00670	4,73 ± 0,03	49,06 ± 3,63	4,07 ± 0,04	1,64 ± 0,31	19,30 ± 0,24	92,63 ± 0,49
	00712	5,35 ± 0,02	52,65 ± 2,18	4,54 ± 0,01	2,09 ± 0,22	18,55 ± 0,17	92,74 ± 0,11
	00713	2,97 ± 0,09	36,00 ± 2,10	4,97 ± 0,03	1,60 ± 0,23	23,33 ± 0,10	91,35 ± 0,16
	00722	3,27 ± 0,07	40,42 ± 0,31	4,40 ± 0,02	1,57 ± 0,54	20,02 ± 0,16	91,07 ± 0,95
	00724	3,99 ± 0,09	42,36 ± 1,81	5,55 ± 0,03	1,44 ± 0,16	29,69 ± 0,06	93,55 ± 0,51
	00726	4,44 ± 0,32	41,99 ± 3,81	4,82 ± 0,08	1,80 ± 0,36	21,51 ± 0,12	90,90 ± 0,14
	00731	4,31 ± 0,07	35,34 ± 1,82	4,86 ± 0,02	1,97 ± 0,45	20,87 ± 0,24	92,20 ± 1,21
	00743	4,30 ± 0,24	26,91 ± 1,48	3,82 ± 0,03	2,40 ± 0,25	21,67 ± 0,21	92,64 ± 1,22
	00755	3,44 ± 0,03	45,51 ± 3,16	4,36 ± 0,01	2,06 ± 0,14	25,76 ± 0,10	92,42 ± 0,26
	00757	3,80 ± 0,05	29,33 ± 0,88	4,43 ± 0,05	2,03 ± 0,06	22,49 ± 0,04	91,94 ± 1,09
00828	4,80 ± 0,11	35,73 ± 0,89	4,54 ± 0,02	1,48 ± 0,27	23,47 ± 0,09	91,61 ± 0,16	
Padrões	00876	4,13 ± 0,10	46,98 ± 3,48	4,10 ± 0,04	1,90 ± 0,06	19,24 ± 0,36	92,65 ± 1,01
	00877	3,57 ± 0,06	45,14 ± 2,35	4,66 ± 0,11	2,10 ± 0,12	22,30 ± 0,15	92,87 ± 0,018
	00878	3,70 ± 0,04	23,40 ± 0,45	4,79 ± 0,02	2,12 ± 0,32	23,33 ± 0,17	91,02 ± 0,82
	00879	3,30 ± 0,08	46,33 ± 1,50	5,43 ± 0,03	1,57 ± 0,29	24,95 ± 0,05	90,05 ± 1,30
	00880	4,63 ± 0,09	47,10 ± 1,93	4,96 ± 0,16	2,22 ± 0,20	20,49 ± 0,20	89,81 ± 0,88
C.*	Catarino	4,19 ± 0,07	30,08 ± 3,57	4,89 ± 0,01	1,69 ± 0,76	20,58 ± 0,50	92,75 ± 0,46
	Preto	3,82 ± 0,09	38,30 ± 1,94	5,67 ± 0,01	2,06 ± 0,29	23,93 ± 0,09	92,07 ± 0,66
NIRS**	00798	5,18 ± 0,09	33,66 ± 2,01	4,88 ± 0,02	1,48 ± 0,03	27,13 ± 0,37	89,50 ± 1,74
	00980	5,51 ± 0,26	28,27 ± 0,62	5,24 ± 0,04	1,26 ± 0,05	24,24 ± 0,36	89,26 ± 1,49
	01944	4,12 ± 0,34	29,83 ± 3,26	5,19 ± 0,03	0,95 ± 0,04	24,73 ± 0,10	89,36 ± 1,76

Nota: valores apresentados em matéria seca sob a forma de média ± desvio padrão de três determinações independentes.

*C. – ISOPs comerciais.

**NIRS – Conjunto de validação do modelo de calibração por PLS na técnica NIRS (ponto 4.2.), não fazendo parte do grupo de centróides regionais previamente estabelecidos, com contribuição independente para a base estatística.

As Tabelas III e V apresentam os valores médios e a variação sumária dos parâmetros nutricionais e minerais, em teor de matéria seca (MS). Em termos médios, o feijão contém um teor de 3,98 g/100g MS em açúcares solúveis, 39,60 g/100g MS de amido, 4,76 g/100g MS de cinzas, 1,97 g/100g de lípidos, 22,45 g/100g de proteína e 91,55 g/100g de resíduo seco (Tabela III).

Tabela III. Análise descritiva da composição centesimal do feijão comum (g/100g MS de farinha).

Parâmetros Estatística	Açúcares solúveis	Amido	Cinzas	Lípidos totais	Proteína bruta	Resíduo Seco
N	24	24	24	24	24	24
Média	3,98	39,60	4,76	1,97	22,45	91,55
Erro Padrão	0,12	1,47	0,10	0,07	0,55	0,24
Moda	2,97	23,40	3,82	1,44	18,55	89,19
Desvio Padrão	0,58	7,21	0,47	0,36	2,70	1,18
Variância	0,34	51,98	0,22	0,13	7,31	1,39
Mínimo	2,97	23,40	3,82	1,44	18,55	89,19
Máximo	5,35	52,65	5,67	2,86	29,69	93,55
Variação	2,38	29,25	1,86	1,42	11,14	4,36

N – número de amostras em triplicado

Ao considerarmos um agrupamento das variedades de feijão de acordo com a sua origem ou de acordo com o seu tipo de crescimento, conseguimos observar alterações na sua constituição nutricional (Tabela IV).

Tabela IV. Composição centesimal média do feijão comum em agrupamentos distintos, em MS de farinha.

Grupos	Açúcares Solúveis	Amido	Cinzas	Lípidos totais	Proteína bruta	Resíduo Seco
Feijão total	3,98 ± 0,58	39,60 ± 7,21	4,76 ± 0,47	1,97 ± 0,36	22,45 ± 2,70	91,55 ± 1,18
Feijão comercial	4,01 ± 0,26	34,19 ± 5,81	5,28 ± 0,55	1,87 ± 0,26	22,25 ± 2,37	92,41 ± 0,48
Cultivares padrão	3,86 ± 0,52	41,79 ± 10,31	4,79 ± 0,48	1,98 ± 0,26	22,06 ± 2,26	91,28 ± 1,43
Feijão regional	4,01 ± 0,64	39,59 ± 6,39	4,69 ± 0,45	1,98 ± 0,40	22,59 ± 2,97	91,53 ± 1,16
Regional rasteiro	4,45 ± 0,20	38,33 ± 9,45	4,39 ± 0,53	1,95 ± 0,33	20,84 ± 1,08	92,09 ± 0,82
Regional trepador	3,87 ± 0,68	39,98 ± 5,61	4,78 ± 0,40	1,99 ± 0,43	23,13 ± 3,18	91,36 ± 1,23

Agrupando todas as variedades de feijão quanto ao tipo de crescimento, o feijão trepador possui em média um teor proteico superior (23,13 g/100g MS) e um menor teor em açúcares solúveis (3,87 g/100g MS) relativamente ao feijão rasteiro (20,84 g/100g MS e 4,45 g/100g MS, respectivamente). Quanto ao agrupamento das variedades de feijão regional, comercial e padrão em conjuntos distintos, houve uma maior variação no teor de amido e cinzas para o feijão comercial relativamente ao regional e ao padrão (Tabela IV).

O teor de cinzas é constituído por elementos minerais, cuja determinação média da sua composição encontra-se representada por cinco macro e cinco micronutrientes (Anexo 2). O feijão contém um teor médio em azoto com 3,50 g/100g MS, fósforo com 0,43 g/100g MS, potássio com 1,57 g/100g MS, cálcio com 0,02 g/100g MS e magnésio com 0,16 g/100g MS como macronutrientes. O feijão contribui igualmente em micronutrientes como o ferro com 6,33 mg/100g MS, cobre com 1,13 mg/100g MS, zinco com 3,14 mg/100g MS, manganês com 1,54 mg/100g MS e em boro com 1,60 mg/100g MS (Tabela V).

Tabela V. Análise descritiva da composição mineral do feijão comum em MS de farinha.

Estatística	Macronutrientes (g/100g)					Micronutrientes (mg/100g)				
	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Boro
N	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Média	3,59	0,43	1,57	0,02	0,16	6,33	1,13	3,14	1,54	1,60
Erro Padrão	0,10	0,01	0,02	0,00	0,00	0,24	0,03	0,10	0,12	0,04
Moda	3,67	0,43	1,55	0,02	0,17	6,00	1,00	3,10	1,50	1,70
Desvio Padrão	0,47	0,06	0,11	0,00	0,02	1,20	0,15	0,55	0,57	0,21
Variância	0,22	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mínimo	3,00	0,30	1,30	0,01	0,12	4,50	0,90	2,30	0,90	1,20
Máximo	4,83	0,58	1,80	0,02	0,18	10,00	1,40	5,00	3,80	2,00
Variação	1,83	0,28	0,50	0,10	0,06	5,50	0,50	2,70	2,90	0,80

N – número de amostras em triplicado

A cultivar regional apresenta um maior teor em azoto, contribuindo para um maior teor em proteína bruta relativamente às cultivares comerciais e padrões. Os feijões pertencentes à variedade comercial apresentaram um maior teor em ferro do que os restantes padrões e regionais. O feijão trepador possuiu, em média, um maior teor em azoto, potássio, ferro, cobre e manganês do que o feijão rasteiro (Tabela VI).

O conteúdo nutricional em MS variou entre os 18,55 e os 29,69 g/100g para a proteína bruta, entre os 23,40 e os 52,65 g/100g para o amido, entre os 2,97 e os 5,35 g/100g para os açúcares solúveis, entre os 1,44 e os 2,86 g/100g para lípidos totais e entre os 3,82 e os 5,67 g/100g para as cinzas. O amido e a proteína bruta foram os parâmetros nutricionais que apresentaram uma maior variância entre os 24 ISOPs, com uma variação relativa nos 29,25 g/100g MS e nos 11,14 g/100g MS, respectivamente (Tabela III).

Quanto a macronutrientes, o conteúdo mineral variou entre os 3,00 e os 4,83 g/100g MS em azoto, entre os 0,30 e os 0,58 g/100g MS em fósforo, entre os 1,30 e os 1,80 g/100g MS em potássio, entre os 0,01 e os 0,02 g/100g MS em cálcio, entre os 0,12 e os 0,18 g/100g MS em magnésio. Micronutrientes como o ferro situaram-se entre os 4,50 e os 10,00 mg/100g MS, o cobre entre os 0,90 e os 1,40 mg/100g MS, o zinco entre os 2,30 e os 5,00 mg/100g MS, o manganês entre os 0,90 e os 3,80 mg/100g MS e o boro entre os 1,20 e os 2,00 mg/100g MS (Tabela V).

Tabela VI. Composição mineral média do feijão comum em agrupamentos distintos, em MS de farinha.

Grupos	Macronutrientes (g/100g)				
	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio
Feijão total	3,59 ± 0,47	0,43 ± 0,06	1,57 ± 0,11	0,02 ± 0,00	0,16 ± 0,02
Feijão comercial	3,25 ± 0,35	0,47 ± 0,07	1,65 ± 0,14	0,02 ± 0,00	0,17 ± 0,02
Cultivares padrão	3,60 ± 0,38	0,48 ± 0,07	1,56 ± 0,15	0,01 ± 0,01	0,16 ± 0,02
Feijão regional	3,62 ± 0,51	0,41 ± 0,05	1,56 ± 0,10	0,02 ± 0,00	0,16 ± 0,01
Regional rasteiro	3,52 ± 0,45	0,44 ± 0,06	1,56 ± 0,15	0,02 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Regional trepador	3,63 ± 0,49	0,42 ± 0,07	1,57 ± 0,09	0,02 ± 0,00	0,16 ± 0,02
Grupos	Micronutrientes (mg/100g)				
	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Boro
Feijão total	6,33 ± 0,00	1,13 ± 0,00	3,14 ± 0,00	1,54 ± 0,00	1,60 ± 0,00
Feijão comercial	7,00 ± 0,00	1,05 ± 0,00	2,90 ± 0,00	1,55 ± 0,00	1,70 ± 0,00
Cultivares padrão	5,40 ± 0,00	1,06 ± 0,00	3,56 ± 0,00	2,26 ± 0,00	1,60 ± 0,00
Feijão regional	6,52 ± 0,00	1,16 ± 0,00	3,02 ± 0,00	1,33 ± 0,00	1,64 ± 0,00
Regional rasteiro	5,90 ± 0,00	1,07 ± 0,00	3,12 ± 0,00	1,51 ± 0,00	1,64 ± 0,00
Regional trepador	6,64 ± 0,00	1,17 ± 0,00	3,12 ± 0,00	1,56 ± 0,00	1,64 ± 0,00

Estudos sobre o valor nutricional do *Phaseolus vulgaris* demonstram que este pode apresentar diferenças entre as variedades. Factores como variedade vegetal, hormonas, temperatura, solo e adubação (nutrientes) podem influenciar directamente a composição centesimal do feijão (Mandal [62]; Kokuszka [76]). Para evitar a influência destes factores, e cingir a variação dos parâmetros nutricionais apenas à origem varietal das amostras, todos os ISOPs utilizados neste estudo foram multiplicados nas mesmas condições no campo de ensaios, minimizando a interferência ambiental no desenvolvimento das amostras. Como as amostras se desenvolveram nas mesmas condições, as diferenças observadas nos parâmetros nutricionais entre ISOPs não deverão resultar de factores ambientais, mas sim das propriedades genéticas inerentes a cada amostra (Mandal [62]; Kokuszka [76]).

4.1.1.1. Resíduo Seco

O resíduo seco é o primeiro parâmetro de qualidade da semente de feijão. A amostra de feijão foi desidratada em sílica gel, segundo as normas de IPGRI/Biodiversity International (Hong [142]), de modo a controlar o teor de humidade na semente. A humidade representa o teor de água presente na semente, sob a forma livre ou ligada aos hidratos de carbono e proteínas. Após este processo, a semente deverá ter uma humidade relativa inferior a 8%, sendo permitido um máximo de 12% de humidade, e um resíduo seco superior a 92%, sendo admitido até um mínimo de 88% (Hong [142]).

Este parâmetro indica-nos o índice de humidade presente na amostra, servindo de controlo da taxa de deterioração das sementes e preservação do material de propagação no

banco de germoplasma, dado que a presença de água afecta a sua conservação (Rao [143]). Por outro lado, este parâmetro é tido em consideração na avaliação nutricional da semente, através da conversão dos dados em matéria seca. Os dados da amostra, convertida em resíduo seco, é contabilizada tendo em conta apenas a amostra desidratada.

O valor da matéria seca da amostra foi determinado, através da desidratação de 1g de amostra, obtendo-se um valor médio de 91,55 g/100g MS, ou seja, 91,55 g de matéria seca/100g de farinha (Tabela III). Os valores obtidos para as amostras analisadas variaram entre os 89,19 e os 93,55 g/100g MS. De acordo com Hong [142], as amostras em análise encontravam-se em bom estado de conservação, mantendo a sua qualidade durante a conservação no banco.

O valor de 89,00 g/100g MS corresponde aproximadamente aos ISOPs 00508, 00534 e 00880 com menor teor de MS (Tabela II), indicando que possuem uma maior proporção de água na sua constituição. Este valor encontra-se em concordância com Eyaru [83]), que apresentou teor idêntico no estudo da digestibilidade no feijão comum *vermelho*. O máximo de 93,55 g/100g MS foi registado para o ISOP 00724. De um modo geral, o teor de matéria seca registado nos ISOPs em estudo encontra-se em consonância com a literatura, embora os valores obtidos sejam mais elevados relativamente a alguns autores. Rodiño [7] e Rodiño [16] utilizaram feijão comum português com um teor de MS que variou entre os 86,00 g/100g e os 90,00 g/100g MS, mostrando-se inferior aos registados (Tabela III). De igual forma, Shimelis [12] e Shimelis [68] apresentaram valores inferiores aos registados, entre os 88,61 g/100g e os 91,00 g/100g MS para o feijão comum africano. Sawazaki [82] obteve um valor substancialmente mais baixo que o registado no presente trabalho e relativamente a outros autores, num estudo do feijão comum durante o armazenamento, com a MS a variar entre os 85,9 g/100g e os 87,3 g/100g MS. Apenas Onwuliri [67] apresentaram valores superiores de MS do feijão, em relação a este trabalho, situados entre os 95,58 g/100g e 95,77 g/100g MS. Aparentemente, a origem das amostras ou variedades e as formas de armazenamento do feijão comum influenciam o rácio final entre a matéria seca e o teor de humidade das sementes.

A matéria seca ou resíduo seco das amostras de feijão foi utilizada em vertentes distintas do estudo das variedades regionais de feijão: na análise nutricional que englobou a determinação do teor dos parâmetros nutricionais da composição da semente, incluindo o teor de cinzas com a respectiva análise de minerais.

4.1.1.2. Hidratos de Carbono

O amido e glícidos (hidratos de carbono) solúveis, para além das fibras, constituem pouco mais de 50% da composição bioquímica ou nutricional do feijão. A percentagem de

amido no feijão situa-se perto dos 42%, enquanto que os hidratos de carbono solúveis (glucose) atinge apenas os 5% (Kozłowska [76]; Altamirano-Hernández [94]).

4.1.1.2.1. Amido

O teor médio de amido nos feijões analisados é de 39,60 g/100g MS, variando entre os 23,40 g/100g MS e os 52,65 g/100g MS (Tabela III), cujo teor mínimo equivale ao acesso 00878 e o máximo ao acesso 00712 (Tabela II). Comparativamente com outros parâmetros da composição centesimal, este foi aquele que apresentou maior variação entre ISOPs (Tabela III).

Confrontando os resultados obtidos para o amido com dados bibliográficos, detecta-se alguma consistência, muito embora os valores médios de amido sejam inferiores aos valores da literatura. Granito [5] obteve um teor médio de 37,06 g/100g MS de amido em farinha de feijão, consistente com o teor médio obtido neste trabalho. Eyarú [83] relatou um teor médio de amido a rondar os 41,6 g/100g MS, num estudo sobre a digestibilidade do amido em feijão comum. Rodiño [7] e Rodiño [16] registaram valores médios de amido em acessos portugueses e ibéricos, situados nos 41,75 g/100g MS e 44,8 g/100g MS, respectivamente.

Composições mais elevadas de amido foram obtidas por Pujolà [3], no estudo da composição proteica e amido em feijão comum, e por Kozłowska [76], no estudo do valor nutricional de feijão preto, com valores de 48,35 e 55 g/100g MS, respectivamente.

Da bibliografia consultada, apenas Sawazaki [82] apresentou valores de amido inferiores ao valor mínimo obtido, com 24 g/100g MS, num estudo sobre as alterações da semente de feijão durante o armazenamento.

Tendo em conta a metodologia adoptada para a determinação de amido neste estudo, constata-se que o método de Hodge [148] mostrou grande sensibilidade na quantificação colorimétrica do amido, com a utilização do reagente de antrona, segundo Dreywood [93]. Este método mostrou-se relativamente sensível, rápido e menos dispendioso comparativamente com técnicas cromatográficas por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) utilizada por Pujolà [3] ou enzimáticas por Eyarú [83].

4.1.1.2.2. Açúcares solúveis

Quanto aos açúcares solúveis nos ISOPs analisados, apresentaram um valor médio de 3,98 g/100g MS, variando entre os 2,97 e os 5,35 g/100g MS, com teor mínimo para o ISOP 00713 e máximo para o ISOP 00712 (Tabela III). O teor médio de açúcares nos acessos de feijão em estudo encontra-se ligeiramente acima aos valores obtidos por

Altamirano-Hernández [94] com 3,63 g/100g MS num estudo sobre a influência dos açúcares solúveis na qualidade do feijão comum.

Em regra geral, os valores de referência para os açúcares solúveis são ligeiramente superiores aos obtidos neste estudo, por exemplo Rodiño [16] obteve teores entre os 3,8 e os 6,5 g/100g MS, Rodiño [7] entre 4,19 e 6,20 g/100g MS e Sawazaki [82] entre 6,30 e 6,60 g/100g MS. Kozłowska [76] registou uma maior variação nos valores de hidratos de carbono solúveis em leguminosas, entre 2,0 e 9,6 g/100g MS, em relação aos trabalhos citados e ao presente estudo.

A comparação de resultados com a literatura permite aferir que o método colorimétrico por McCready [147], com adaptações segundo Bailey [89], mostrou-se sensível na detecção dos açúcares solúveis pela reacção do reagente de antrona para com a glucose. Este método permitiu obter resultados comparáveis com a determinação dos açúcares solúveis em amostras de feijão com GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) no trabalho de Altamirano-Hernández [94], com um resultado de 5,00 g/100g MS.

4.1.1.3. Lípidos Totais

Na análise deste parâmetro, houve a necessidade de realizar a extracção prévia do amido na amostra, pois interferiam na determinação da fracção lipídica que se apresentava sobreavaliada e contaminada por este componente. Pomeranz [94] referem que os lípidos encontram-se geralmente ligados às proteínas e hidratos de carbono, como é o caso do amido, dificultando a extracção lipídica.

O teor médio de lípidos totais obtidos para as amostras de feijão em estudo situaram-se nos 1,97 g/100g MS, com valor mínimo de 1,44 g/100g MS no ISOP 00724 e máximo de 2,86 g/100g MS no ISOP 00480 (Tabela III). Estes valores de lípidos são inferiores aos valores apresentados por Bhatti [57] e Sathe [52]. Bhatti [57] relatou a presença de 2,45 g/100g MS em amostras controlo num estudo sobre a melhoria do valor nutricional do feijão comum, através da suplementação à base de carne. Sathe [52], denotou uma variação lipídica entre os 1,0 e os 4,3 g/100g MS num trabalho de revisão acerca da funcionalidade proteica do feijão.

Por outro lado, o teor lipídico nos ISOPs estudados é relativamente superior a alguns valores bibliográficos, nomeadamente entre os 0,67 e 1,19 g/100g MS por Shimelis [12], entre 1,02 g/100g MS e 1,22 g/100g MS por Onwuliri [67], entre 0,94 e 1,80 g/100g MS por Rodiño [7], entre 1,0 e 2,0 g/100g MS por Rodiño [16], entre 1,25 e 2,12 g/100g MS por Antunes [106], entre 0,6 e 2,38 g/100g MS por Kaur [48], entre 1,7 e 2,4 g/100g MS por Sawazaki [82], entre 0,53 e 2,55 g/100g MS por Mesquita [37] e entre 3,14 e 3,62 g/100g MS por Siddiq [49], respectivamente. Dois estudos sobre a análises da qualidade nutricional

(Marzo [104]) e físico química do feijão cozido (Shiga [69]) permitiram obter valores médios para a fracção lipídica entre os 1,35 e os 2,0 g/100g MS para os grupos controlo (feijão crú), respectivamente. Granito [5] registou um teor intermédio situado nos 1,60 g/100g MS. O teor médio da fracção lipídica respectivamente aos ISOPs em estudo é consistente com os valores dos trabalhos anteriores.

Neste estudo utilizou-se o método de Bligh [97] para a determinação dos lípidos totais na farinha de feijão, que demonstrou ser comparável à técnica de Soxhlet (1879) utilizada pela maioria das referências bibliográficas. Dado que o material em análise apresenta baixo teor lipídico, este método mostrou ser eficiente e sensível no estudo de amostras de feijão, como previra Iverson [99], que recomendaram a sua utilização em amostras pobres em lípidos.

4.1.1.4. Proteína Bruta e Azoto

Entre os parâmetros nutricionais estudados no feijão, a proteína é aquele que tem maior importância, devido ao seu teor, composição aminoácida e propriedades nutracêuticas (Duranti [51]). Porém, Baudoin [59] indicam que as proteínas das leguminosas são nutricionalmente pobres sem tratamento térmico prévio. Como tal, embora o teor de proteína bruta seja relativamente abundante nos ISOPs analisados (Tabela III), este possui uma biodisponibilidade condicionada.

O teor médio de proteína bruta registado foi de 22,45 g/100g MS, com valores máximos registados para os ISOP 00724 (*Vermelho*) com 29,69 g/100g MS e 00460 (*Vergalheiro*) com 27,21 g/100g MS, respectivamente (Tabelas II e III). Os teores mais baixos de proteína situaram-se nos 18,55 g/100g MS para o ISOP 00712, seguido de 19,24 g/100g MS para o ISOP 00876 e 19,30 g/100g MS para o ISOP 00670 (Tabela II).

Os valores proteicos obtidos encontram-se de acordo com a literatura, apresentando variação quanto aos teores mínimos e máximos publicados. O teor de proteína bruta foi superior ao valor obtido nos seguintes trabalhos: estudo de variedades de feijão africano com valores situados entre os 17,96 e os 22,07 g/100g MS (Shimelis [12]; Shimelis [68]); análise do valor nutricional de 4 cultivares de feijão brasileiro com registo de valores entre os 23,37 e os 25,77 g/100g MS (Antunes [106]); estudo da variabilidade genética em 20 *landraces* portuguesas de feijão com uma variação do teor proteico entre 17,96 e 27,45 g/100g MS (Coelho [15]). Ao mesmo tempo os resultados obtidos estão em concordância com os dados compilados por Sathe [52] e Bhatta [57] com 20,43 g/100g MS; Granito [5] com 22,43 g/100g MS; Shiga [69]; Siddiq [49] com 23,9 g/100g MS; Saha [70] e Kaur [48] com variação entre os 16,00 g/100g e os 26,00 g/100g MS. Em contrapartida, acessos de feijão português (Rodiño [7]; Rodiño [16]) e africano (Onwuliri [67]) apresentaram valores de

proteína bruta superiores (30 g/100g MS) aos obtidos no presente estudo, cujo valor máximo corresponde ao trabalho de Pujolà [3] com o registo de 32,0 g/100g MS em feijão.

A limitação de nutrientes, como é o caso do azoto e enxôfre, condiciona directamente o estímulo na produção de proteínas de reserva ao nível dos cotilédones das mais variadas cultivares de feijão (Singh [72]; Mandal [62]; Kokuszka [76]). O principal factor que influencia o conteúdo de azoto nos grãos é o adubo. A absorção de azoto na planta dá-se após a conversão de azoto orgânico em azoto mineral pela própria (Andrade [73]).

O método de Kjeldahl utilizado para a determinação do teor de proteína bruta em farinha de feijão é idêntico à metodologia utilizada pelos vários autores referidos, embora com algumas adaptações quanto à técnica. O principal inconveniente nesta técnica reside na produção de resíduos em excesso, além dos seus custos relativamente elevados.

4.1.1.5. Cinzas

As cinzas, obtidas por incineração da amostra, são o resíduo mineral representativo de praticamente toda a matéria inorgânica da amostra (DeMan [58]). O método na obtenção de cinzas é similar ao da literatura, a partir de incineração da amostra a 550°C durante 5 horas.

O conteúdo de cinzas neste estudo variou entre os 3,82 g/100g MS, valor mínimo e os 5,67 g/100g MS, valor máximo, relativo aos acessos 00743 e *Preto* (comercial), respectivamente. O valor médio para as amostras de feijão em estudo foi de 4,76 g/100g MS (Tabela III).

Kaur [48] obteve um teor mais elevado de cinzas através da análise de propriedades estruturais e físico-químicas de 50 acessos de feijão, obtendo uma variação entre os 3,0 e 6,0 g/100g MS. Siddiq [49] através do estudo das características e funcionalidades do feijão, obteve um conteúdo em cinzas muito próximo de 5 g/100g MS. O valor máximo de cinzas registado por Siddiq [49] foi igualmente observado num acesso de feijão preto, apesar de inferior ao obtido no presente estudo. Bhatti [57], Mesquita [37], Granito [5], Saha [70] e Shimelis [12] obtiveram valores de cinzas relativamente próximos e concordantes com o teor obtido neste trabalho, registados entre os 3,00 e os 5,00 g/100g MS. Onwuliri [67] registaram um menor teor em cinzas, com 2,86 g/100g e 3,11 g/100g MS em duas variedades de feijão comum melhoradas da Etiópia.

4.1.1.5.1. Minerais

Os resíduos sólidos (cinzas) obtidos para as variedades de feijão foram analisados a partir de técnicas colorimétricas e espectroscópicas de absorção atómica em 10 elementos

minerais distintos. Foram identificados 10 elementos minerais no resíduo sólido das amostras de feijão, onde 5 são macronutrientes e 5 são micronutrientes (Anexo 2).

Os elementos minerais que compõem as cinzas das amostras de feijão comum em estudo encontra-se dividido em macro e micronutrientes (Anexo 2), com comparação do seu teor médio em relação a outros trabalhos (Anexo 1) e respectiva análise descritiva desses mesmos minerais (Tabela V), de modo a facilitar a discussão dos resultados obtidos.

Os macronutrientes consistem em 5 elementos minerais como o azoto, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, brevemente abordados de seguida.

O teor médio de fósforo obtido foi de 0,43 g/100g MS e varia entre os 0,30 g/100g os e os 0,58 g/100g para os ISOPs 00722 e 00879, respectivamente. Estes valores encontram-se em concordância com os valores de referência de vários autores, embora alguns deles apresentem valores relativamente superiores aos obtidos para o fósforo. Como tal, Granito [5] no estudo para melhoria na qualidade nutricional em farinha e semente de feijão por fermentação natural registou um teor de 0,44 g/100g em fósforo e Saha [70] com estudo da variabilidade nutricional em 35 acessos, registou valores entre os 0,36 e os 0,49 g/100g. Oomah [154], no estudo mineral em 10 variedades de feijão canadiano, apresentou teores de fósforo mais próximos dos obtidos neste trabalho, com 0,50 a 0,66 g/100g registados. O trabalho de Mesquita [37] obteve um máximo de 0,72 g/100g no estudo da composição química de 21 linhagens de feijão comum.

Relativamente ao potássio, outro macronutriente importante na composição mineral do feijão, apresentou um teor médio de 1,57 g/100g MS e uma variação entre os 1,30 e os 1,80 g/100g MS para os ISOPs 00670 e 00879. Os valores do teor de potássio obtidos são inferiores aos obtidos pelos autores citados (Anexo 1). Apenas Saha [70] obteve um teor de potássio inferior ao do presente trabalho, entre 0,98 e 1,29 g/100g. Mesquita [37] determinou o teor mais elevado para o potássio, situado entre 1,51 e 2,48 g/100g.

Quanto ao cálcio, este apresenta valores reduzidos nas amostras das variedades regionais de feijão. O teor mínimo de cálcio situa-se nos 0,01 g/100g, comum a vários ISOPs: 00713, 00731, 00878, 00879, 00880, sendo o teor máximo 0,02 g/100g MS para os restantes ISOPs (Anexo 2). Este teor de cálcio é comparativamente inferior em relação aos resultados apresentados por Mesquita [37], entre os 0,03 e 0,28 g/100g (Anexo 1). Shimelis [12] com um estudo que envolveu 8 variedades de feijão melhorado da região da Etiópia, Onwuliri [67] com um estudo de 2 variedades de feijão comum e como o trabalho de Oomah [154], apresentaram aproximadamente teores entre os 0,08 e os 0,20 g/100g de cálcio, superiores aos registados. Guzmán-Maldonado [1] no estudo do teor mineral e proteico entre 70 acessos de feijão selvagem e Granito [5] no estudo de 2 cultivares obtiveram valores igualmente superiores aos registados, com 0,19 g/100g em cálcio. Os baixos valores de cálcio nas variedades regionais de feijão pode ser uma consequência das condições edáfico-ecológicas do arquipélago da Madeira.

O magnésio apresenta um teor médio de 0,16 g/100g, variando entre os 0,12 g/100g para o ISOP 00877 e os 0,18 g/100g para os ISOPs Catarino, 00460, 00508, 00670 e 00879, respectivamente. Estes valores são similares aos apresentados por outros autores, nomeadamente Oomah [154] com valores entre 0,15 e 0,21 g/100g, e Granito [5] com 0,16 g/100g, respectivamente. Mesquita [37] apresentaram valores bem superiores aos obtidos, dado que o valor mínimo deste corresponde ao máximo obtido neste ensaio (0,18 g/100g).

Quanto aos microminerais, consistiram em 5 elementos minerais como o ferro, cobre, zinco, manganês e boro. Estes apresentam teores bastante inferiores em relação aos macrominerais, sendo a sua necessidade na dieta alimentar diária de apenas 1mg a 50mg/100g de alimento (World Health Organization [55]). Estes micronutrientes são brevemente abordados de seguida.

O ferro é a principal fonte mineral obtida em leguminosas, tendo um importante peso na escolha da variedade que melhor contribua com este micromineral na alimentação diária (World Health Organization [55]). No presente trabalho obteve-se algumas diferenças na composição deste mineral entre ISOPs, variando entre 4,50 mg/100g (ISOPs 00878 e 00880) e 10,00 mg/100g (ISOP 00755) (Anexo 2), com uma média de 6,33 mg/100g (Tabela V). Como tal, o teor de ferro em estudo encontra-se dentro dos valores de referência, com um teor superior relativamente aos trabalhos efectuados por Oomah [154] com 2,83 a 6,66 mg/100g e Shimelis [12] com 6,23 a 8,40 mg/100g. Onwuliri [67] detectou uma maior diferença entre amostras relativamente ao teor de ferro, em relação aos outros autores e ao presente estudo, com uma variação entre as 8,46 mg/100g e as 35,10 mg/100g de amostra. De igual forma, Onwuliri [67] apresentaram valores acima da média para o ferro, denotando-se uma grande divergência nos valores que se situaram entre os 8,46 e os 35,10 mg/100g (anexo 1).

O cobre é um mineral que existe essencialmente em legumes, pelo que o seu teor obtido foi evidentemente superior nos acessos de feijão em estudo do que nos referenciados. Com um teor médio de cobre nos 1,13 mg/100g de amostra e uma variação desde os 0,90 mg/100g (ISOPs 00724 e 00876) e os 1,40 mg/100g (ISOPs 00534 e 00722) nos ISOPs em estudo, a proporção deste micromineral é superior à obtida por Oomah [154] e Saha [70] com 0,01 a 0,88 mg/100g e 0,18 a 0,75 mg/100g, respectivamente. Os valores de cobre obtidos encontram-se em consonância com os dados de Mesquita [37], com teores entre os 1,14 e os 1,77 mg/100g.

O zinco, sendo um micromineral igualmente presente em grão de leguminosas, variou desde os 2,3 mg/100g (ISOP 00828) aos 5,00 mg/100g (ISOP 00722), com um teor médio de 3,14 mg/100g de farinha de feijão. O teor de zinco apresenta maior proximidade relativamente ao trabalho de Saha [70], com um máximo de 4,48 mg/100g. Os restantes autores obtiveram um valor inferior aos obtidos, com excepção de Mesquita [37] que apresentou um máximo de 6,99 mg/100g.

Quanto ao manganês e ao boro, sendo estes dois últimos micronutrientes caracterizados de ultra-microminerais, apresentam valores médios de 1,54 mg/100g e 1,60 mg/100g, respectivamente. O teor de manganês mostrou-se consistente com os dados de Mesquita [37] e Saha [70] com 2,89 g/100g e 3,94 g/100g como teores máximos, respectivamente. Os únicos dados conhecidos para o teor de boro indicam a presença de 0,9 a 1,34 mg/100g de feijão, embora inferior ao obtido no presente estudo (Oomah [154]).

4.2. Avaliação da composição centesimal da semente de feijão por NIRS

Após a análise centesimal das amostras em estudo, por técnicas analíticas convencionais e recolha dos dados relativos aos teores de cada parâmetro (no ponto 4.1.1.), procedeu-se à avaliação nutricional das variedades regionais de feijão, com recurso à técnica de absorção espectral na região perto do infravermelho (NIRS). Para o efeito, os resultados anteriores foram utilizados na elaboração de modelos de calibração, através de construção de equações de calibração por análise multivariada PLS. O objectivo consistiu na criação de uma base de dados da composição bioquímica do feijão que possibilite a análise recorrente de amostras biológicas.

Para tal, criou-se um projecto designado de *Feijão* no *software* WinISI 1.5 de modo a proceder à introdução dos respectivos ficheiros necessários à calibração, previsão e avaliação dos modelos adoptados. A partir daqui desenvolveu-se equações de calibração à base de quimiometria, onde a base de qualquer análise por NIRS começa pela determinação do erro dos métodos de referência (SEC) no desenvolvimento dos modelos de calibração. Segundo Williams [139], o desenvolvimento e a precisão do modelo de calibração por PLS dependerá das análises de referência para verificação dos resultados previstos pela técnica de NIRS.

Testou-se dois modelos de regressão por MPLS e PLS e, a partir dos dados produzidos de cada um deles, obteve-se os respectivos modelos de calibração. O modelo por PLS foi aquele que demonstrou possuir menor valor residual entre os valores da calibração e previsão, e menor erro associado à calibração, pelo que procedeu-se à escolha do modelo PLS para apresentação dos resultados obtidos pela técnica NIRS.

4.2.1. Desenvolvimento do modelo de calibração PLS

O desenvolvimento do modelo de calibração PLS no NIRS iniciou-se com a introdução de espectros NIR na construção de um conjunto de calibração, utilizando os valores de referência determinados analiticamente. Para tal, criou-se um ficheiro de calibração (.cal) e introduziu-se os valores de bancada (referência) dos 24 ISOPs em estudo (Tabela I) num total de 72 doseamentos (análise em triplicata).

Adicionalmente utilizou-se 3 ISOPs como conjunto de validação externa do modelo de calibração PLS construído, sendo estes o 00798, 00980 e o 01944. Deste modo obteve-se um conjunto de espectros NIR, correspondendo cada espectro à calibração individual para cada amostra, através do registo de absorções significativas produzidas pelas suas vibrações intermoleculares em radiação de reflectância difusa (R) (Figura 7).

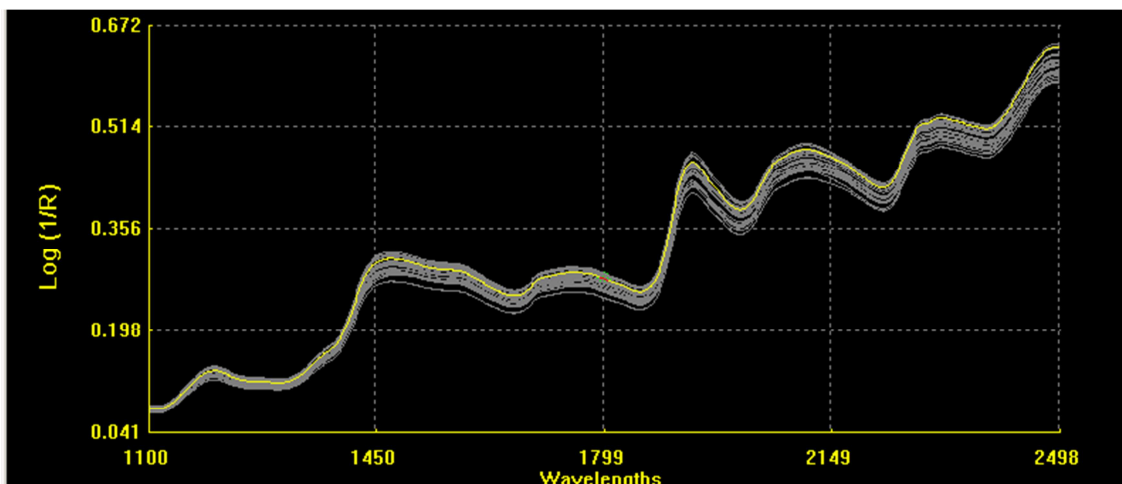


Figura 7. Representação global dos espectros NIR do conjunto de calibração, em Absorvância ($\text{Log}(1/R)$) Vs Comprimento de Onda, a partir dos dados obtidos da análise centesimal do feijão por técnicas analíticas convencionais.

A principal região do espectro situou-se entre os 1100 e os 2498,2 nm, aproximadamente, estando de acordo com Hermida [141]. A área de interesse foi escolhida com base no maior factor de correlação (R^2) ou menor erro de previsão. O modelo matemático dos espectros NIR obtidos foi determinado a partir de equações de regressão por PLS e dos valores de referência correspondentes a cada parâmetro, efectuando-se uma série de pré-tratamentos à base de quimiometria. O pré-tratamento espectral consistiu numa optimização pelo *software* WinISI II por correcção à base de algoritmos por Variação de Padrão Normal (SNV), com o objectivo de minimizar o erro amostral relacionado com a densidade e tamanho das partículas na amostra, eliminar os efeitos de deslocamento da linha de base espectral (*detrend* (DET)) ou eliminar os picos sobrepostos e alisamento destes pelo uso da primeira derivada (1,4,4,1) (Figura 8). De modo a avaliar as diferentes calibrações obtidas pelo pré-tratamento, recorreu-se ao SEC, SECV e R^2 para o conjunto de calibração e Bias, SEP e R^2 para o conjunto de validação interna.

Como o número de dados iniciais era limitado para a construção de um modelo robusto, usou-se a validação cruzada segundo Burns [131], Hermida [141] e Hacisalihoglu [133], uma vez que o número de amostras não é suficiente para a separação em dois conjuntos (calibração e validação). O modelo apresentado desta forma não apresenta robustez de dados em termos de amostras utilizadas na calibração, na ordem das centenas, mas o presente modelo é representativo do tipo de material em análise com uma vasta gama de valores de referência, em termos de variação dos parâmetros nutricionais, segundo Burns [131].

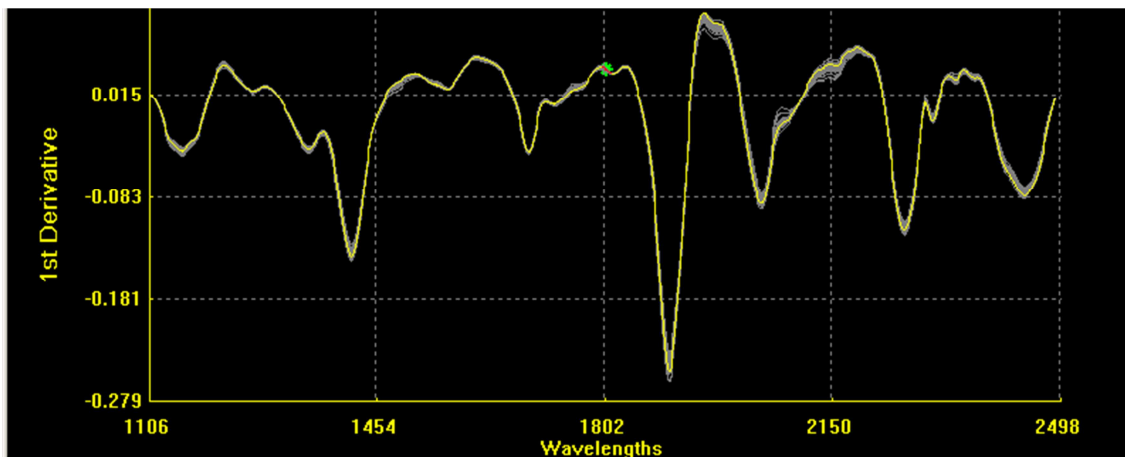


Figura 8. Representação global de espectros NIR do conjunto de calibração, após tratamento matemático por SNV, DET e 1ª derivada (1,4,4,1).

A validação cruzada é um meio de validação do modelo de calibração e determinação do número de factores ideais, complementada pela validação externa de modo a testar a robustez do modelo final. A validação da calibração com amostras independentes é denominada de validação externa. Deste modo envolveu-se ambas as técnicas de referência e NIR, permitindo verificar se ambas estão estatisticamente de acordo (Burns [131]). Os ISOPs 00798, 00980 e 01944, conforme referido, foram utilizados como amostras independentes para validação externa do modelo de calibração, enquanto os dados analíticos dos restantes 24 ISOPs compuseram o grupo de calibração. A tabela VII sumaria os valores de referência utilizados, registados sob a forma de média, variação entre mínimos e máximos e o desvio padrão relativamente a cada parâmetro, considerando cada triplicado uma amostra distinta, que compõem o conjunto de calibração de 72 amostras ($N = 72$) e validação externa de 9 amostras ($N = 9$), respectivamente. Do conjunto de calibração, várias amostras foram eliminadas (*outliers*), num todo de 72 amostras, por apresentarem diferenças significativas entre valores de referência e previstos (Tabela VIII).

Tabela VII. Valores da composição da farinha de feijão nos conjuntos de calibração e validação determinados por gravimetria ou espectrofotometria, em g/100g MS (ou % MS).

Parâmetro	Conjunto Calibração (N = 72)			Conjunto Validação Externa (N = 9)		
	Média	Varição	SD	Média	Varição	SD
Resíduo Seco	91,55	86,56 - 94,05	1,50	89,37	87,46 - 90,93	1,45
Proteína	22,45	18,40 - 29,75	2,67	25,37	23,82 - 27,56	1,37
Lípidos	1,97	1,04 - 2,99	0,44	1,23	0,92 - 1,50	0,23
Açúcares	3,98	2,86 - 5,37	0,58	4,94	3,73 - 5,75	0,66
Amido	39,60	22,89 - 54,77	7,37	30,59	26,10 - 35,27	3,09
Cinzas	4,76	3,79 - 5,68	0,47	5,10	4,86 - 5,28	0,17

N = número total de amostras; SD – Desvio Padrão relativamente a N.

O número de *outliers* foi determinado consoante o erro SECV, diminuindo o número de factores PLS utilizados. O número de factores PLS, automaticamente escolhido pelo *software*, foi seleccionado de modo a apresentar o menor erro na validação cruzada, situando-se entre 6 a 8 factores para a previsão dos parâmetros de qualidade. A Tabela VIII mostra-nos o número de factores PLS e *outliers* na calibração, bem como valores de SEC, SECV e R² para os 6 parâmetros determinados no conjunto de calibração.

Tabela VIII. Dados estatísticos para o conjunto de calibração

Componente	H	T	F	SEC (%)	R ²	SECV (%)
Resíduo Seco	0	2	6	0,98	0,231	1.14
Proteína	0	3	8	0,15	0,995	0.19
Lípidos	0	2	8	0,28	0,410	0.33
Açúcares	0	0	7	0,25	0,651	0.30
Amido	0	3	8	3,15	0,694	3,83
Cinzas	0	3	8	0,20	0,809	0,24

T e H – *outliers*; F – número de factores PLS usados na calibração

A eliminação dos *outliers* no conjunto de calibração torna a calibração mais robusta maximizando a variabilidade na composição amostral e o leque de espectros, com o intuito de evitar *outliers* H no conjunto de validação.

Como tal, obteve-se valores baixos para o erro padrão da calibração cruzada (SECV), sem registos de *outliers* H no conjunto de calibração e validação interna, indicando-nos de que a calibração foi bem efectuada. Porém, por obtermos baixa incidência de *outliers* e valores de erro (SEC e SECV) relativamente baixos, não foram suficientes para executar uma calibração satisfatória para o resíduo seco e lípidos totais, com baixo coeficiente de correlação (R²) entre eles. O número limitado de dados e a variabilidade de cada parâmetro pode originar uma recta de calibração pouco robusta, com valor de R² distante da unidade,

como observamos para o resíduo seco ($R^2 = 0,231$), lípidos totais ($R^2 = 0,410$), açúcares solúveis ($R^2 = 0,651$) e amido ($R^2 = 0,694$), sendo aceitável para os últimos dois parâmetros (Tabela VIII). Por outro lado, a proteína bruta e cinzas apresentaram dados suficientes para a construção de uma recta de calibração fiável, com $R^2 = 0,995$ e $R^2 = 0,809$ (Tabela VIII), respectivamente.

Contudo, ao compararmos os valores obtidos na previsão por NIRS relativamente aos dados de referência, denotamos semelhanças entre as duas técnicas. Estas apresentaram um erro padrão (SED(C)) e desvio padrão (SD) baixos, indicando-nos de que a calibração pelo método PLS tornou-se eficiente (Tabela IX) para o conjunto de calibração pouco robusto.

O amido foi o único parâmetro que mais se distanciou na previsão por NIRS, subvalorizando o registo de valores previstos relativamente aos de referência, apresentando um maior erro padrão associado às duas técnicas. Uma possível explicação é a variabilidade relativamente ao máximo (54,77 g/100g MS) e mínimo (22,89 g/100g MS) obtidos por bancada (Tabela VII), apenas com a detecção de 3 *outliers* (Tabela VIII), sugerindo que a calibração requer novas modificações ou então os valores foram considerados imprecisos pela técnica NIRS, dada a limitação de dados. Um outro factor que poderá estar relacionado, segundo Williams [139], é a selecção do comprimento de onda durante o desenvolvimento do modelo de calibração. Embora as amostras apresentem espectros semelhantes no geral (Figura 8) durante a calibração, o *software* poderá favorecer algumas amostras de acordo com o espectro, enquanto que outras amostras que defiram ligeiramente nos valores de absorvância irão apresentar diferenças na previsão.

Tabela IX. Previsão por NIRS dos parâmetros de composição centesimal a partir dos dados de referência (bancada) em g/100g MS.

Parâmetro	Amostras de Calibração								
	Variação Bancada (g/100g MS)			Variação NIR (g/100g MS)			Regressão por PLS		
	Min	Max	Média	Min	Max	Média	β^a	SD ^b	SED(C) ^c (%)
Resíduo Seco	86,56	94,05	91,55	89,84	94,20	91,69	0,97	0,89	1,48
Proteína	18,40	29,75	22,45	18,33	29,70	22,47	1,01	2,65	0,25
Lípidos	1,04	2,99	1,98	1,32	2,59	1,95	0,96	0,32	0,44
Açúcares	2,86	5,37	3,98	3,08	4,97	3,98	1,00	0,50	0,40
Amido	22,89	54,77	39,60	23,88	49,28	38,69	0,85	5,88	4,98
Cinzas	3,79	5,68	4,76	3,95	5,60	4,78	0,92	0,39	0,32

^a β - Inclinação da recta de calibração (*slope*); ^bSD – Desvio Padrão da previsão;

^cSED(C) – erro padrão da diferença entre valores de referência por bancada e previstos por NIRS corrigido por Bias

Partindo das amostras e parâmetros acima descritos, nos pontos seguintes encontram-se os modelos de calibração PLS dos 72 espectros, com análise entre os

métodos de referência por bancada e previsão por NIRS para a validação interna, com respectivos dados estatísticos.

Encontram-se igualmente representados os dados da validação externa relativamente ao método de calibração em uso. O conjunto de validação externa, como já foi anteriormente referido, consistiu num grupo de 3 amostras independentes ao grupo de calibração (ISOPs 00798, 00980 e 01944), com a leitura em triplicado por NIRS-PLS, conferindo 9 análises de previsão relativamente a cada um dos parâmetros em análise por esta técnica.

4.2.1.1. Resíduo Seco

Para a previsão do teor de resíduo seco (ou matéria seca) nos ISOPs em estudo, englobando variedades regionais, comerciais e padrões, obteve-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,318 para a regressão a partir dos métodos de referência *versus* análise por NIRS, erro padrão de previsão (SEP) de 1,24% e valor de Bias de -0,14 (Figura 9).

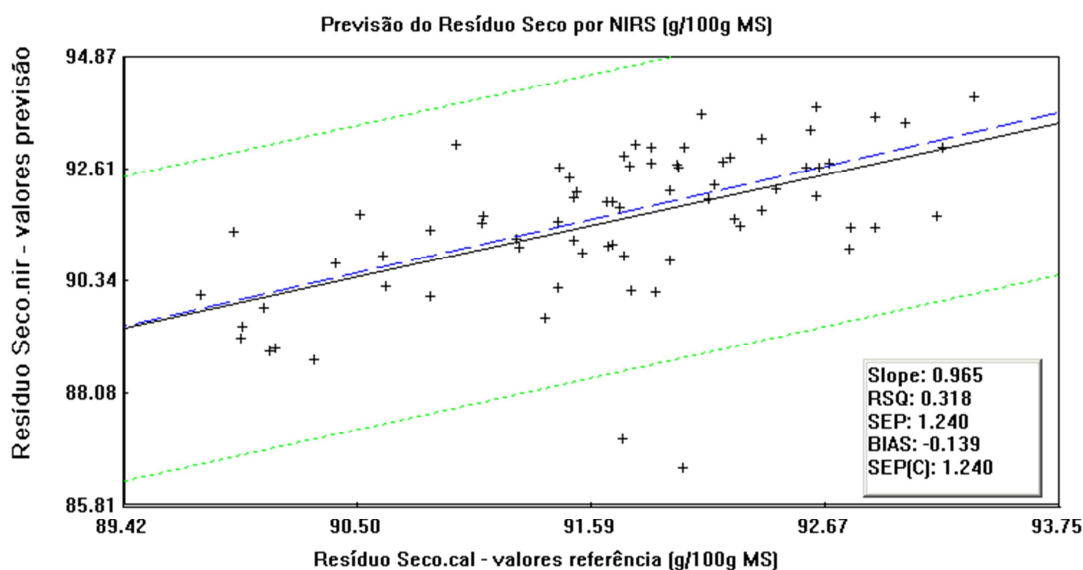


Figura 9. Recta de calibração para a previsão do Resíduo Seco obtida pelo modelo PLS.

Observou-se alguma dispersão dos dados de referência e previsão que compõem a recta de calibração do modelo avaliado. O teor médio de matéria seca registado na previsão por validação cruzada situou-se nos 91,69 g/100g (Tabela IX), correspondendo a 8,31 g/100g de humidade nas amostras de feijão. No espectro de calibração foram identificadas duas bandas de absorção de água, situando-se a primeira entre os 1788 e os 1796 nm e a segunda entre os 1936 e os 1946 nm.

Os valores da matéria seca previstos a partir dos dados da calibração interna, registaram alguma divergência entre as duas técnicas, provavelmente devido à alteração do

teor de humidade da amostra, durante o período de tempo entre a análise convencional e a leitura no NIRS. Hermida [141] determinou o teor de humidade em 121 amostras de farinha de feijão distintas, com construção de um modelo robusto para a previsão deste parâmetro ($R^2 = 0,94$) e com erro de previsão baixo (SEP = 0,39%).

Comparando os resultados de resíduo seco (g/100g MS) com as amostras do conjunto de validação externa obtidos pelos métodos AOAC 925.10 e NIRS-PLS, os valores previstos por NIRS apresentaram-se ligeiramente superiores aos obtidos por bancada (Tabela X), observando-se um valor residual negativo de 1,97 g/100g MS.

Tabela X. Previsão por NIRS do teor de Resíduo Seco de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.

Parâmetro	Conjunto validação externa (N = 9)						
	Variação Bancada (g/100g MS)			Variação NIR (g/100g MS)			
	Média	Variação	SD	Média	Variação	SD	Resíduo
Resíduo Seco	89,37	87,46 - 90,93	1,45	91,34	90,30 - 92,08	0,78	-1,97

Dado que o valor de referência médio registou-se nos 89,37 g/100g MS e a previsão por NIRS-PLS nos 91,34 g/100g MS, a diferença entre estes dois métodos é considerada baixa dada a habilidade de previsão do modelo (pouco robusto) e coeficiente de correlação relativamente baixo ($R^2 = 0,32$).

4.2.1.2. Proteína Bruta

No espectro NIR (Figura 8), observa-se essencialmente duas zonas de absorção proteica, na região correspondente aos 2050 – 2066 nm e dos 2178 – 2186 nm. A previsão do teor proteico no feijão manteve-se semelhante ao teor de referência, rondando os 22,40 g/100g MS (Tabela IX). A calibração deste parâmetro demonstrou uma boa exactidão na análise por NIRS, com valor de Bias neutro, R^2 nos 0,996 e baixo erro associado à previsão (SEP = 0,18%), como podemos observar na Figura 10. O facto do erro associado à técnica analítica por Kjeldahl (SEC = 0,15%) apresentar-se baixo, fez com que a previsão do modelo e a validação apresentassem valores de erro igualmente reduzidos, aumentando a precisão do modelo neste parâmetro (Tabela VIII).

Registou-se, embora com menor número de amostras em análise, um modelo de calibração com melhor capacidade de previsão do que relativamente ao trabalho de Hermida [141], onde obtiveram um modelo com coeficiente de correlação de 0,94 e um erro padrão para a previsão de 0,56 em amostras de farinha de feijão usando o modelo de regressão por mínimos quadrados parciais modificado (MPLS). Hacısalihoglu [133] determinou igualmente o teor proteico em 91 acessos de semente de feijão pelo modelo

PLS, e obteve igualmente um menor coeficiente de correlação ($R^2 = 0,86$) e um erro de previsão significativo ($SEP = 1,40\%$).

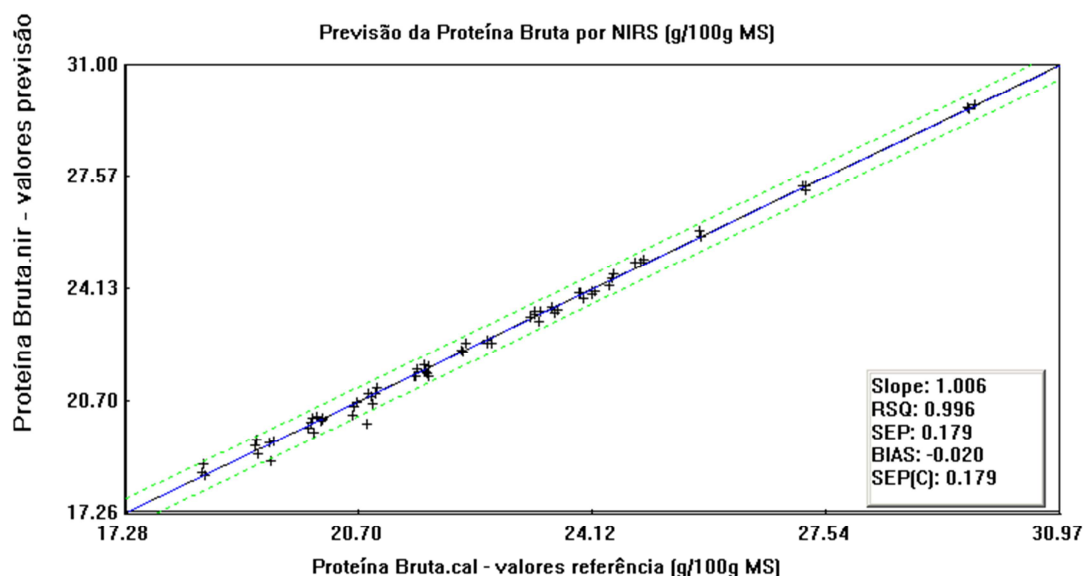


Figura 10. Recta de calibração para a previsão da Proteína Bruta obtida pelo modelo PLS.

Comparando os resultados da proteína bruta (g/100g MS) obtidos pelos métodos de Kjeldahl e NIRS-PLS para as amostras do conjunto de validação externa, observou-se um valor residual de apenas 0,98 g/100g MS entre ambas as técnicas (Tabela XI). Desta forma, o modelo mostrou ser suficientemente robusto, tornando a previsão consistente com os valores de bancada registados para as amostras externas em análise.

Tabela XI. Previsão por NIRS do teor de Proteína Bruta de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.

Parâmetro	Conjunto validação externa (N = 9)						
	Variação Bancada (g/100g MS)			Variação NIR (g/100g MS)			
	Média	Variação	SD	Média	Variação	SD	Resíduo
Proteína Bruta	25,37	23,82 - 27,56	1,37	24,39	22,99 - 26,41	1,59	0,98

4.2.1.3. Lípidos totais

A determinação do teor lipídico por NIRS obteve um valor de Bias praticamente neutro (Bias = 0,027), conduzindo a um erro de previsão relativamente baixo ($SEP = 0,30\%$) e coeficiente de correlação moderado ($R^2 = 0,53$) para a validação interna, como podemos observar na Figura 11. Embora o erro associado aos dados de referência obtidos

analiticamente para a calibração seja reduzido, (SEC = 0,28%, Tabela VIII), não foi suficiente para obtermos um coeficiente de correlação suficientemente robusto. Como na extracção por *química molhada* os lípidos encontraram-se ligados a moléculas de amido que, segundo Pomeranz [95], é normal estes encontrarem-se ligados a carboidratos, poderá de certa forma influenciar a previsão a partir dos dados de referência. Daí que podemos igualmente observar uma dispersão relativa das amostras ao longo do espaço, relativamente às amostras de referência e previsão por NIRS.

Os lípidos totais foram a maior limitação na previsão por NIRS na construção do modelo por PLS por Hermida [141], embora obtivessem um melhor registo na previsão lipídica relativamente ao presente trabalho.

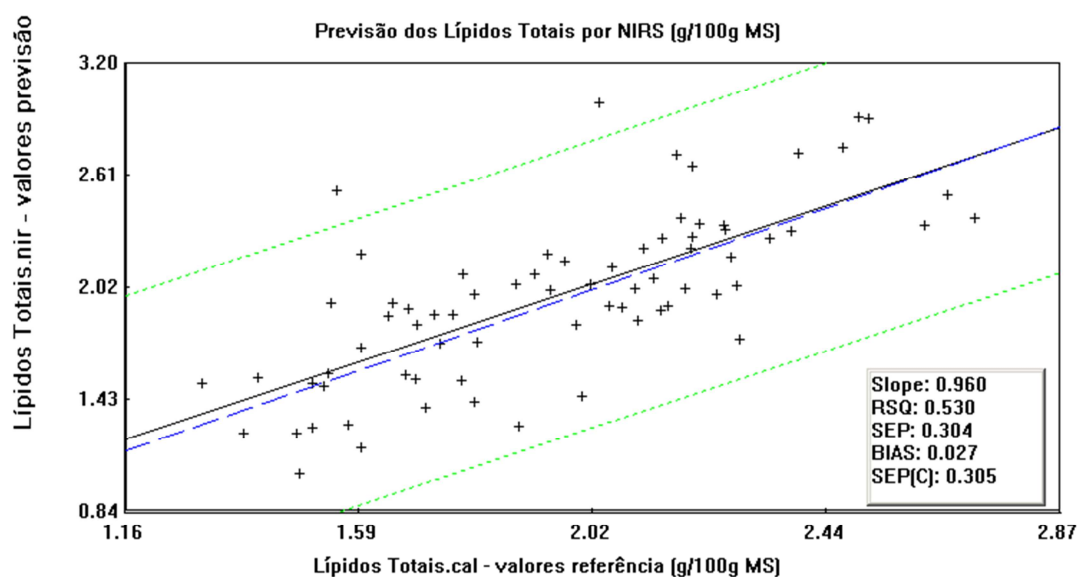


Figura 11. Recta de calibração para a previsão dos Lípidos Totais obtida pelo modelo PLS.

No teste do modelo de previsão por NIRS-PLS, observou-se uma ligeira diferença entre os dois métodos utilizados na determinação do teor lipídico no conjunto de validação externa (Tabela XII). Dado que a previsão do conteúdo lipídico foi superior em 0,83 g/100g MS comparativamente ao teor obtido por bancada, o valor residual proveniente dos dois métodos ainda é considerável, sendo consistente com os dados obtidos na validação interna.

Tabela XII. Previsão por NIRS do teor de Lípidos Totais de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.

Parâmetro	Conjunto validação externa (N = 9)						
	Variação Bancada (g/100g MS)			Variação NIR (g/100g MS)			
	Média	Variação	SD	Média	Variação	SD	Resíduo
Lípidos Totais	1,23	0,92 - 1,50	0,23	2,06	1,36 - 2,87	0,66	-0,83

4.2.1.4. Açúcares solúveis

A previsão dos açúcares solúveis por NIRS apresenta uma ligeira similaridade com os dados de calibração, com um registo neutro da Bias (0,00) e SEP nos 0,23% (Figura 12). O coeficiente de correlação para a previsão rondou os 0,84, indicando-nos uma calibração suficientemente robusta para um teor de açúcares solúveis relativamente baixo, obtendo-se um teor médio equitativo para ambas as técnicas, situando-se nos 3,98 g/100g MS (Tabela IX). Relativamente à determinação deste parâmetro noutros trabalhos, não se encontrou referências para farinha de feijão de modo a obtermos um termo de comparação relativamente à calibração efectuada.

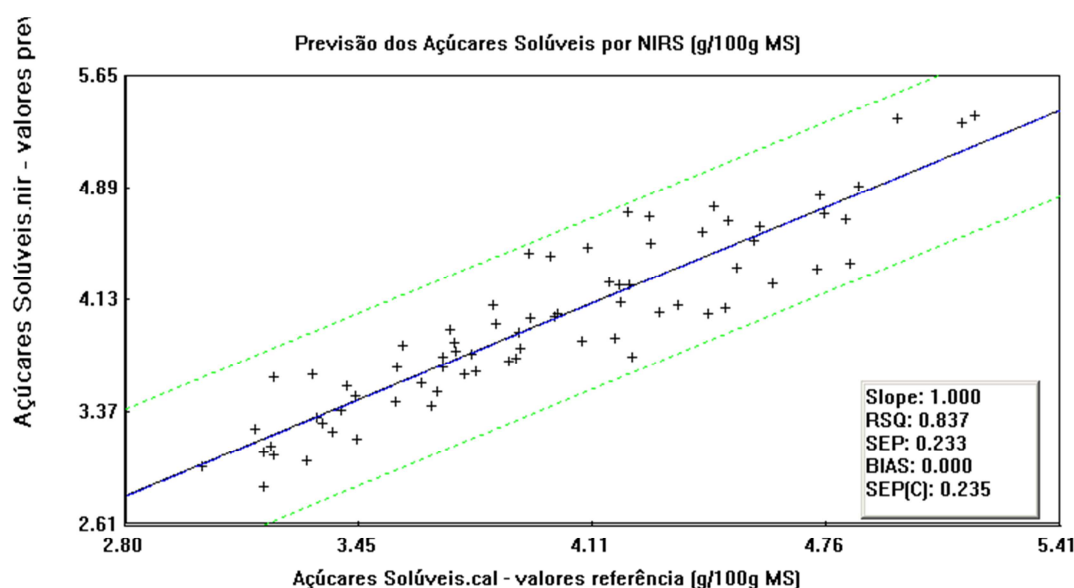


Figura 12. Recta de calibração para a previsão dos Açúcares Solúveis obtida pelo modelo PLS.

A comparação dos resultados da previsão dos açúcares solúveis (g/100g MS) com as amostras do conjunto de validação externa obtidos espectrofotometricamente por Bailey [89] e NIRS-PLS, permitiu determinar um valor residual de 0,91 g/100g MS (Tabela XIII).

Tabela XIII. Previsão por NIRS do teor de Açúcares solúveis de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.

Parâmetro	Conjunto validação externa (N = 9)						
	Variação Bancada (g/100g MS)			Variação NIR (g/100g MS)			
	Média	Variação	SD	Média	Variação	SD	Resíduo
Açúcares solúveis	4,94	3,73 - 5,75	0,66	4,03	3,56 - 4,52	0,39	0,91

Os valores de previsão foram inferiores aos valores de bancada, apesar dos dados obtidos na calibração interna indica-nos uma calibração suficientemente robusta. Uma causa

provável para os valores de previsão se distanciarem dos valores de bancada para as amostras externas, deve-se ao facto dos valores de referência para os açúcares solúveis utilizados na calibração serem inferiores aos valores do conjunto de validação externa (Tabela VII).

4.2.1.5. Amido

A previsão deste parâmetro foi a que registou uma maior discrepância relativamente aos dados de referência (Tabela IX), visto apresentarem um erro relativamente significativo (SEC = 3,15%) e, segundo Williams [139], a validação do modelo apresenta igualmente um valor de erro significativo (SECV = 3,83%) (Tabela VIII). A Figura 13 apresenta um valor de Bias próximo da unidade (Bias = 0,91), com um erro padrão na previsão superior ao da calibração (SEP = 5,31%) e coeficiente de correlação de 0,50.

Hacisalihoglu [133] obteve valores similares para o coeficiente de correlação ($R^2 = 0,56$) e para o erro de previsão (SEP = 5,5%) num estudo que envolveu a determinação de amido em sementes de feijão.

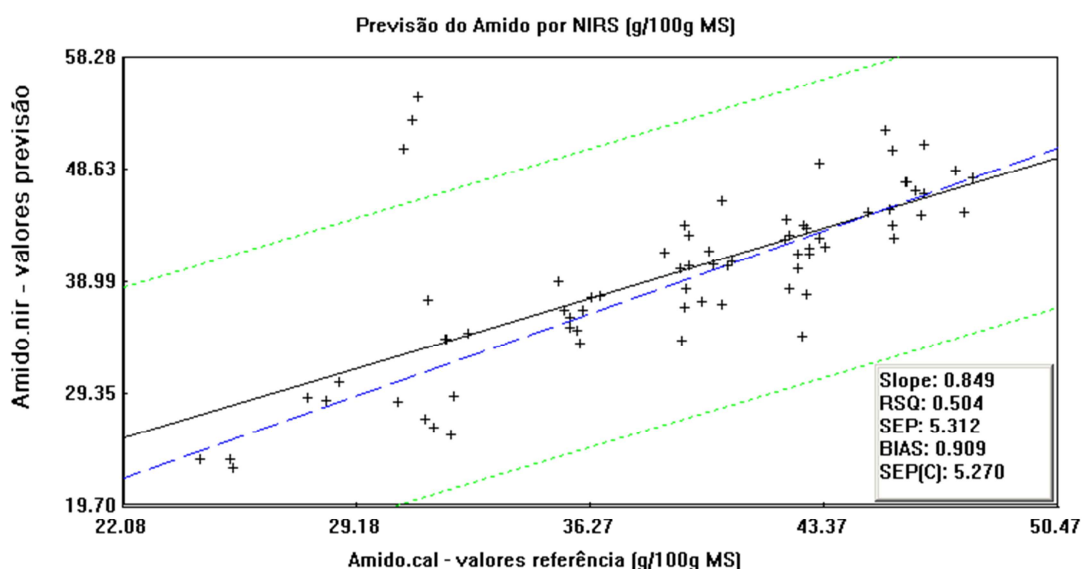


Figura 13. Recta de calibração para a previsão do Amido obtida pelo modelo PLS.

A previsão do conjunto de validação externa apresentou um maior teor de amido por análise NIRS-PLS do que o método espectrofotométrico por Hodge [148]. Dado que os valores analíticos e a validação cruzada apresentaram um erro significativo na calibração do método, a validação externa apresenta igualmente um erro associado à previsão, com previsão média de 9,17 g/100g MS superior ao teor médio de bancada (Tabela XIV). Estes factores podem estar associados à idade da farinha ou mesmo nas variações anteriormente mencionadas. Estes dados indicam que a previsão deste parâmetro requer novas

modificações e optimizações para a calibração por regressão PLS, dado que a amostragem utilizada neste trabalho e segundo o trabalho de Hacisalihoglu [133], não foi suficiente para alcançar uma determinação exacta.

Tabela XIV. Previsão por NIRS do teor de Amido de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.

Parâmetro	Conjunto validação externa (N = 9)						
	Variação Bancada (g/100g MS)			Variação NIR (g/100g MS)			
	Média	Variação	SD	Média	Variação	SD	Resíduo
Amido	30,59	26,10 - 35,27	3,09	39,76	36,81 - 39,76	2,82	-9,17

4.2.1.6. Cinzas

As cinzas que estão associadas ao teor mineral da amostra, costumam ser de difícil detecção pela técnica NIRS, devido ao facto desta técnica apenas detectar grupos funcionais XH_n (O-H, N-H, C-H e S-H) presentes em material orgânico. Segundo Osborne [155], a detecção das cinzas pela técnica NIRS efectua-se de um modo indirecto, através da ligação dos minerais a complexos orgânicos (como lípidos, celulose) ou quelatos (iões metálicos ligados a compostos orgânicos) por ligações de hidrogénio. O teor médio das cinzas determinado por previsão NIRS foi 4,78 g/100g MS o que é comparável ao valor do teor de cinzas por determinação analítica, 4,76 g/100g MS (Tabela IX). Na previsão do teor de cinzas nas farinhas das variedades regionais de feijão, o erro associado à validação interna do modelo PLS (SECV) foi de 0,24% (Tabela VIII), com um erro de previsão (SEP) a rondar os 0,23% (Figura 14).

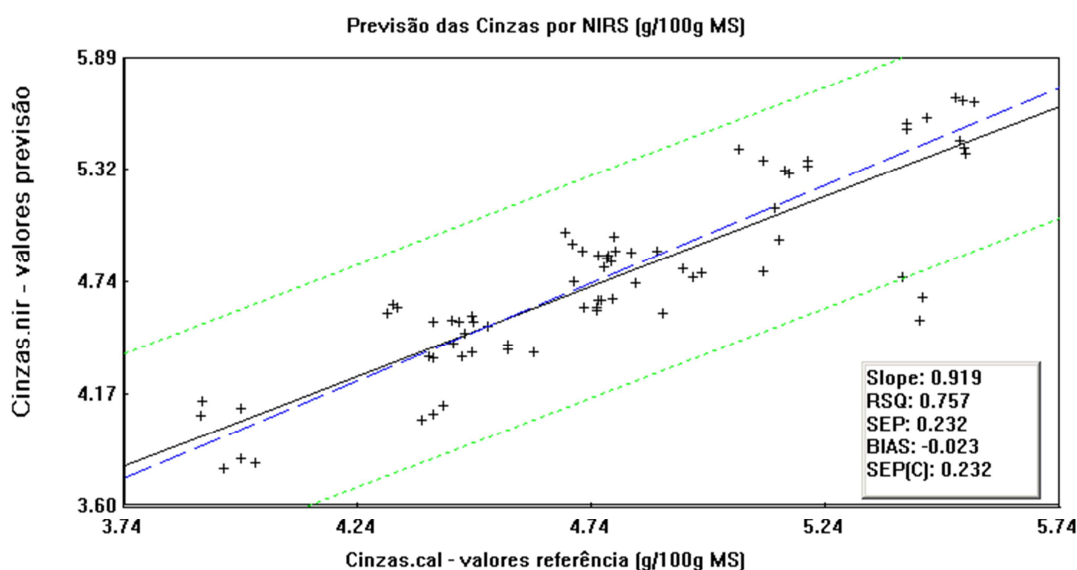


Figura 14. Recta de calibração para a previsão das Cinzas obtida pelo modelo PLS.

O coeficiente de correlação na previsão apresentou-se inferior ($R^2 = 0,757$) em relação ao coeficiente de calibração ($R^2 = 0,809$).

Para o conjunto de validação externa, obteve-se 0,35 g/100g MS de resíduo entre os valores de bancada e previsão por NIRS-PLS (Tabela XV). Como tal, o modelo de calibração por PLS foi capaz de realizar uma boa previsão do teor de cinzas para os ISOPs 00798, 00980 e 01944, com o registo de um valor inferior relativamente aos de bancada.

Tabela XV. Previsão por NIRS do teor de Cinzas de amostras externas à calibração, a partir do modelo de calibração por PLS, em g/100g MS.

Parâmetro	Conjunto validação externa (N = 9)						
	Variação Bancada (g/100g MS)			Variação NIR (g/100g MS)			
	Média	Variação	SD	Média	Variação	SD	Resíduo
Cinzas	5,10	4,86 - 5,28	0,17	4,75	4,33 – 5,04	0,32	0,35

Os modelos desenvolvidos por PLS apresentaram coeficientes de correlação relativamente elevados para as cinzas e proteína bruta, com erros de previsão baixos. Os restantes modelos necessitarão de uma calibração mais robusta e de modificações quanto à quimiometria de modo a permitir a determinação dos parâmetros de qualidade com maior rigor.

A espectroscopia NIR associada a técnicas de análise multivariada consegue quantificar todos os parâmetros em estudo, permitindo distinguir amostras das variedades regionais, quanto às suas características nutricionais, exigindo uma preparação reduzida da amostra, com conseqüente custo de análise muito reduzido.

4.3. Propriedades anti-nutricionais da semente do feijão comum

O estudo da actividade anti-nutricional do feijão baseou-se na determinação da actividade inibitória da faseolamina (α -AI). A presença e quantidade de faseolamina foram determinadas, através da sua acção sobre a hidrólise do amido pela α -amilase do pâncreas suíno (PPA). A faseolamina está presente nos extractos de feijão, sendo a sua actividade inibitória um dos factores que diminui a digestibilidade dos hidratos de carbono. Para efeitos de quantificação da faseolamina, a actividade catalítica da PPA foi determinada, segundo Obiro [11], na ausência e presença de extracto de feijão, a fim de proceder à quantificação e modelação da α -AI.

4.3.1. Variação de faseolamina (α -AI) no feijão comum

A reacção lenta (30min) e termicamente controlada (37°C) permite a formação de um complexo ESI abortivo da faseolamina com a enzima e substrato, sendo responsável pela inibição de 80% da actividade da PPA, no caso do ISOP 00478, cujos ensaios se encontram representados na Figura 15. O teste de inibição (Ti) apresenta uma coloração similar ao branco de inibição (Bi) que contém apenas o extracto. Quanto maior o grau de inibição da PPA, menos intensa é a coloração da mistura reagente, indicando uma menor produção de maltose a partir do amido (substrato), sob acção da PPA. O processo inverso ocorre na ausência de inibidor (ensaio Ce), cuja coloração da mistura reagente é mais intensa do que *Ti*. De acordo com Baks [156], quanto maior for a concentração de substrato presente na mistura reagente, maior concentração de maltose será produzida pela PPA conferindo maior intensidade à coloração da mistura reagente.

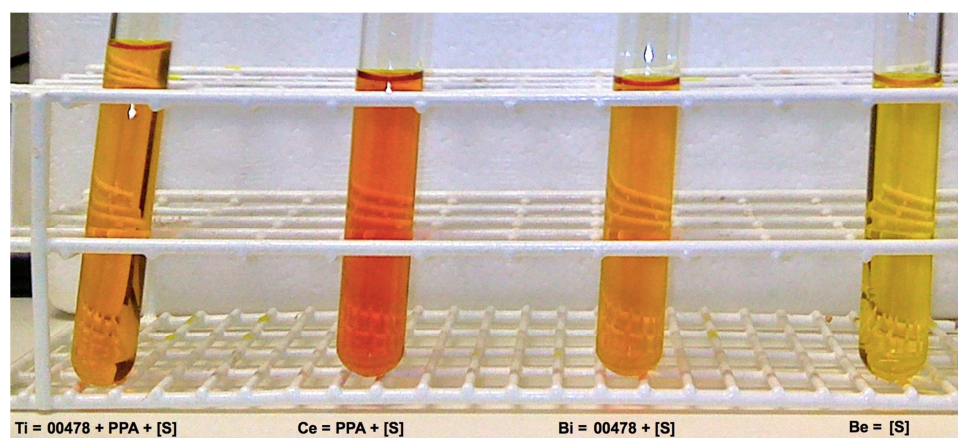


Figura 15. Teste de Inibição do α -AI do acesso 00478 sobre a PPA.

Os resultados da variação da “actividade” de faseolamina são apresentados de seguida, com a identificação da variedade regional, com maior teor de faseolamina. Entre as 24 amostras de feijão, a maior eficiência inibitória da PPA foi detectada no acesso 00478 (feijão *Filipe*), com 80,24% de inibição, seguido do 00726 (feijão *vassoura rasteiro*) com 74,01% e do 00743 (feijão) com 73,65% (Figura 16). Por outro lado, a cultivar padrão 00877 (feijão *Sanilac*) e as variedades regionais 00828 (feijão *amarelo*) e 00731 (feijão *rasteiro vassoura*) apresentam apenas 20,28%, 27,20% e 28,03% de capacidade inibitória, respectivamente.

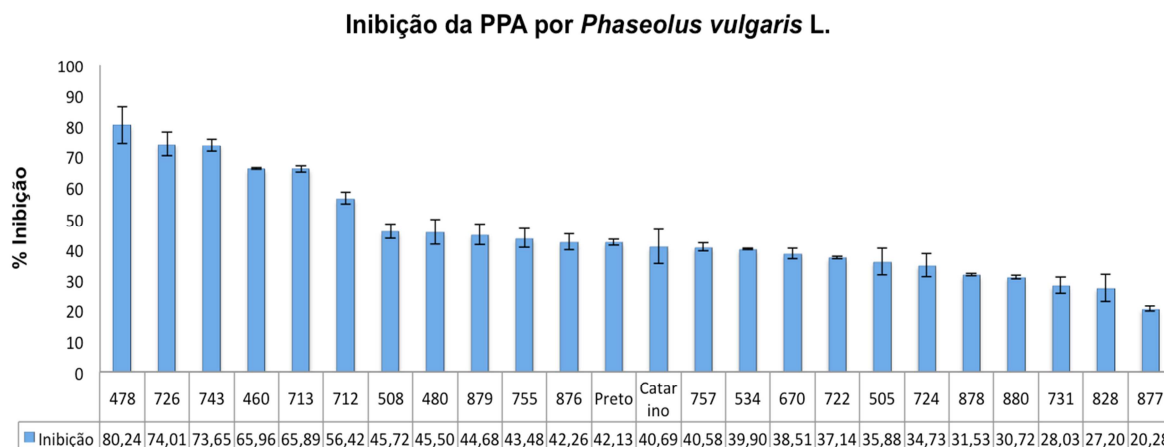


Figura 16. Gráfico representativo da inibição da PPA pelos ISOPs de feijão comum em percentagem média de inibição e respectivas barras de erro.

Os resultados demonstram a presença e uma actividade significativa da faseolamina entre as variedades regionais de feijão. Tentou-se estabelecer o mecanismo de acção, competitivo ou não competitivo, através da modelação da sua actividade. Na presença de um volume constante de extracto, a acção inibitória da faseolamina sobre a PPA pode ou não depender da quantidade de amido (substrato) na solução. Se a extensão da inibição depende apenas da concentração do inibidor (Koukiekolo [126]) esta tem um carácter não-competitivo. Por conseguinte, modelou-se a actividade do inibidor em todos os ISOPs em estudo, optando-se por apresentar apenas os resultados obtidos para dois deles, visto serem representativos da performance do extracto de feijão enquanto inibidor da PPA. Na presença de diferentes concentrações de amido e volumes de extracto dos ISOPs 00726 e 00877, observaram-se variações na formação de maltose sob acção da PPA (Figura 17).

A inibição pela α -AI ocorre com a formação do complexo enzima-inibidor (EI), durante a incubação (Santimone [123]), onde a PPA é incubada juntamente com o inibidor antes de ser adicionado o substrato. No conjunto dos ensaios de inibição Ti (1) variou-se o inibidor (I), aumentando a quantidade de extracto (I) em 0,1ml para S01 I01, em 0,2ml para S01 I02, e em 0,3ml para S01 I03, numa concentração constante de 0,1mM de substrato. O procedimento foi adoptado nos restantes conjuntos Ti (2) e Ti (3), mas na presença de

concentrações constantes de amido de 0,3 e 0,6mM, respectivamente (Figura 17). Como a mistura reagente apresentava um volume contante de enzima (PPA) e variando apenas a quantidade de extracto (inibidor) e amido (substrato), não observou-se saturação na formação dos complexos EIS. O aumento da formação de maltose foi proporcional à adição do extracto nos diferentes testes de inibição (Ti) (Figura 17), o que nos indica que a quantidade de extracto presente não inibiu totalmente a acção da PPA, indicando a ocorrência de uma inibição não-competitiva, de acordo com Koukiekolo [126] e Desseaux [117].

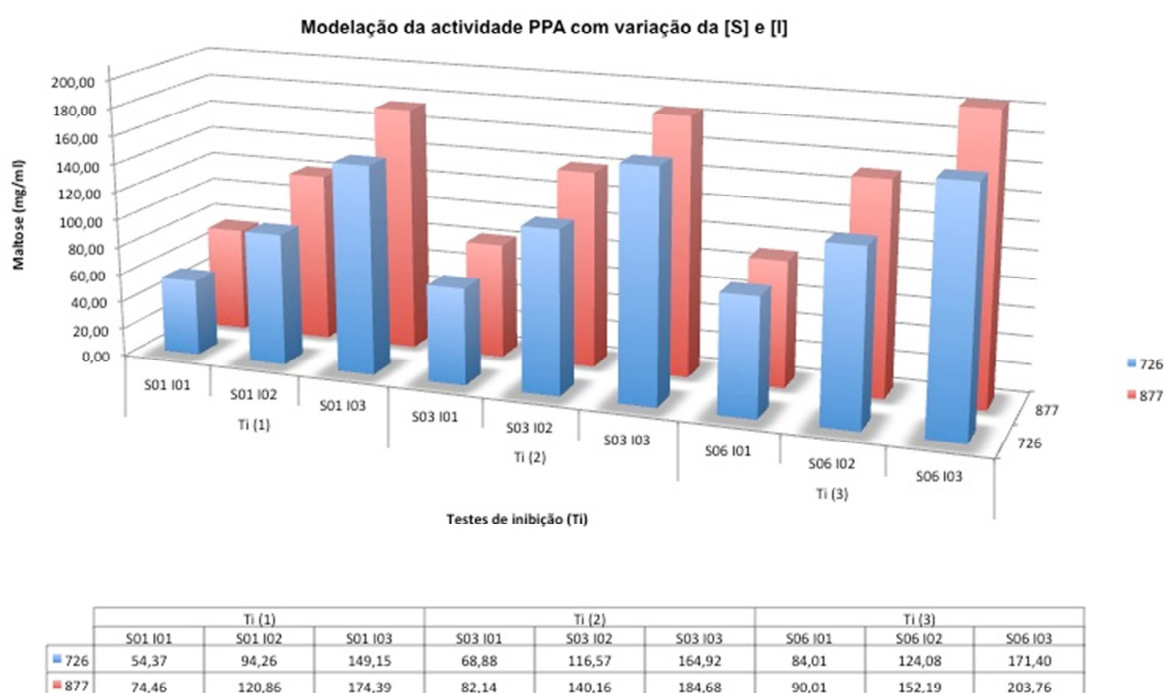


Figura 17. Representação gráfica da modelação da actividade da PPA na presença da α -AI do extracto dos ISOPs 00726 e 00877, com representação da quantidade respectiva de maltose libertada.

De igual forma, com o aumento da concentração de substrato, também se observa um ligeiro aumento de maltose após formação do complexo EIS. Porém, podemos observar que em relação ao ISOP 00877, o ISOP 00726 continua a apresentar uma maior capacidade de inibição da PPA, com menor formação de maltose em todos os conjuntos de ensaios de inibição (Ti) (Figura 17).

Na modelação da cinética enzimática, com ajuda do programa SigmaPlot, obteve-se um gráfico linear, onde o aumento da concentração do inibidor na mistura reagente dá-nos informação sobre o tipo de inibição, através da representação linear das dependência da V_{max} e K_m aparentes. Na Figura 18 encontra-se representada a modelação do comportamento cinético de PPA na presença do ISOP 478, em três concentrações distintas de amido (eixo horizontal) e de α -AI (eixo vertical). A relação entre a variação da V_{max} da

enzima e a inibição pelo α -AI manifesta-se no decréscimo do parâmetro cinético, com o aumento da quantidade de inibidor, sendo este comportamento característico da inibição enzimática não-competitiva pela faseolamina.

Direct Linear Plot

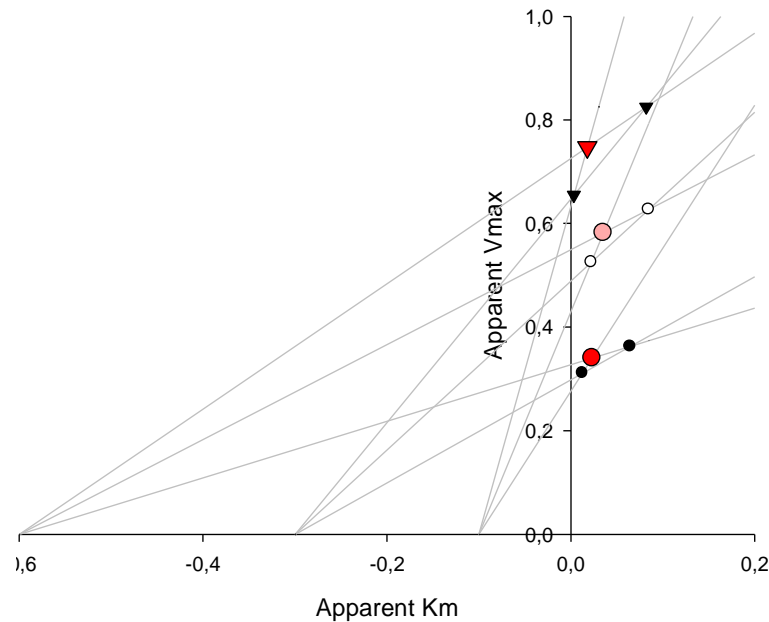


Figura 18. Interpretação linear directa das linhas definidas pelo substrato e velocidade da reacção do ISOP 00478, com intersecções dessas linhas nos símbolos a preto e branco, e médias dessas interações em tons vermelhos.

Desta forma, o ISOP 00478 apresenta inibição não-competitiva, tal como todos os ISOPs envolvidos neste estudo. Esta análise cinética permitiu calcular o valor aparente de K_m (Apparent K_m) para a reacção EIS. O cálculo do valor médio de K_m foi de 0,0428. Segundo Arnaut [127] valores baixos de K_m correspondem a complexos ES fortes, dada a grande afinidade da PPA para com o substrato em estudo. A inibição não-competitiva da amilase pela faseolamina diminui a digestibilidade dos hidratos de carbono e abre perspectivas de utilização destes feijões no controlo do índice glicémico.

4.4. Comparação e análise dos parâmetros nutricionais e anti-nutricionais

Esta última parte corresponde à interpretação e discussão estatística dos resultados centesimais, minerais e anti-nutricionais obtidos convencionalmente nos pontos anteriores para os feijões regionais, comerciais e padrões, com uma breve abordagem nos pontos que se seguem.

4.4.1. Correlação entre ISOPs nos diferentes parâmetros nutricionais e anti-nutricionais

As principais interligações foram registadas nas cinzas, proteína e azoto com os restantes parâmetros centesimais e minerais, correlações estas linearmente positivas. Poucos são os autores que realizaram correlações ao nível dos parâmetros nutritivos, o que torna limitativo em termos de comparação com a literatura acerca dos dados obtidos a este nível.

A proteína encontra-se significativamente correlacionada com o azoto, cinzas, potássio, ferro e zinco. As cinzas apresentam uma correlação positiva moderada, embora significativa ($r = 0,45$; $p \leq 0,05$) para com a proteína, o que indica que estas variáveis estão linearmente correlacionadas. O potássio ($r = 0,46$; $p \leq 0,05$), o ferro ($r = 0,55$; $p \leq 0,01$) e o zinco ($r = 0,54$; $p \leq 0,01$) apresentam uma correlação moderada positiva, com significância moderada a forte para com a proteína. O azoto apresenta uma correlação significativa positiva forte ($r = 0,79$; $p \leq 0,01$) com a proteína, dado que o aumento de azoto está directamente relacionado com a síntese de proteína. A proteína bruta foi determinada através do teor de azoto total presente na amostra, utilizando o factor de conversão do azoto para obter a proteína total, o que faz pressupor estes se encontrem interligados. Saha [70] apenas observou uma forte correlação negativa entre a proteína bruta e o potássio ($r = -0,43$; $p \leq 0,01$).

As cinzas encontram-se positivamente correlacionadas com o potássio ($r = 0,49$; $p \leq 0,05$) e zinco ($r = 0,49$; $p \leq 0,05$). Saha [70] também detectou uma correlação positiva moderada entre cinzas e zinco.

Entre os constituintes minerais das cinzas, o ferro apresenta uma correlação moderada positiva com o cálcio, tal como o cobre com o boro e o zinco com o manganês, com $r = 0,41$ e $p \leq 0,05$, respectivamente. O potássio ($r = 0,47$; $p \leq 0,05$) e o zinco ($r = 0,49$; $p \leq 0,05$) apresentam uma correlação moderada positiva para com o azoto, enquanto que o boro ($r = -0,56$ e $p \leq 0,01$) encontra-se negativamente correlacionado com este. O manganês ($r = 0,55$; $p \leq 0,01$) e o zinco ($r = 0,45$; $p \leq 0,05$) encontram-se positivamente

correlacionados com o fósforo, enquanto que Oomah [154] apenas registou uma correlação moderada negativa entre o potássio e o zinco.

A faseolamina não encontrou-se linearmente correlacionada com qualquer outro parâmetro em estudo.

4.4.2 Análise de variância simples (*One-Way ANOVA*) e comparação múltipla

Os valores médios dos parâmetros centesimais e anti-nutricionais dos acessos de feijão foram utilizados na análise estatística para identificar quais aqueles que permitem distinguir os acessos de feijão em estudo, através do teste *One-Way ANOVA* na análise de variância por distribuição normal. Para tal, testou-se a normalidade dos parâmetros utilizando o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que todos os parâmetros em estudo apresentaram uma distribuição normal com valor de significância (*p-value* ou *p*) superior a 0,05 (Anexo 3).

Realizou-se o teste *one-way ANOVA* para todos os parâmetros em diferentes agrupamentos de feijão, tendo em conta o tipo de crescimento e a origem deste (Tabelas IV e VI). Nenhum destes agrupamentos apresentou diferenças significativas em qualquer um dos parâmetros, com $p > 0,05$ e teste de F inferior à dezena. Tendo em conta o teor médio de cada parâmetro, efectuou-se a análise ANOVA para cada acesso com obtenção de diferenças altamente significativas em todos os parâmetros, com valores de $p \leq 0,01$. As cinzas e proteína bruta apresentaram uma maior variância com teste de F correspondentes a 190,07 e 620,59, respectivamente (dados não apresentados). Através do teste de Tukey HSD na análise de médias ao nível de significância de 5% de probabilidade, determinou-se por comparação múltipla quais os acessos que diferiram significativamente nos diferentes parâmetros analisados em ANOVA (Anexo 4).

No resíduo seco (ou matéria seca), praticamente não se detectou diferenças significativas entre ISOPs, através do teste de Tukey. Em termos globais, apenas o ISOP 00724 (feijão *vermelho*) se distinguiu dos ISOPs 00508 (feijão *milheiro*) e 00534 (feijão *vaginha*), respectivamente; No amido, houveram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os ISOPs estudados, não se verificando nenhum ISOP que se exceptue ou isole num todo; Nos açúcares, o ISOP 00712 (feijão *vaginha*) foi o único acesso a isolar-se; A análise lipídica foi aquela que apresentou menor distinção significativa entre ISOPs; A variação da proteína bruta permitiu obter uma maior distinção entre ISOPs, dado que praticamente todos se distinguem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). Os ISOPs 00724 (feijão *vermelho*), 00460 (feijão *vergalheiro*), 00755 (feijão *valinho*) e 00712 (feijão *vaginha*), foram os únicos a diferenciarem-se significativamente ($p \leq 0,05$) ao nível proteico entre os restantes; Os valores de cinzas apresentam uma grande variação, com grande incidência de diferenças significativas registadas entre ISOPs, onde apenas o 00743 (feijão) conseguiu

distinguir-se integralmente ($p \leq 0,05$), relativamente aos restantes ISOPs; Na faseolamina, registou-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre ISOPs, onde apenas os acessos 00478 (feijão *Filipe*), 00726 (feijão *vassoura rasteiro*) e o 00743 (feijão) isolaram-se relativamente aos restantes (Anexo 4).

4.1.1 Análise multivariada por componentes principais (PCA)

Por análise multivariada dos componentes principais (PCA), obteve-se a distribuição espacial dos acessos com base nos valores médios obtidos para os parâmetros nutricionais em análise, através do programa MVSP v3.1. A contribuição das características nutricionais para a separação espacial dos acessos de feijão encontram-se representado na Figura 19.

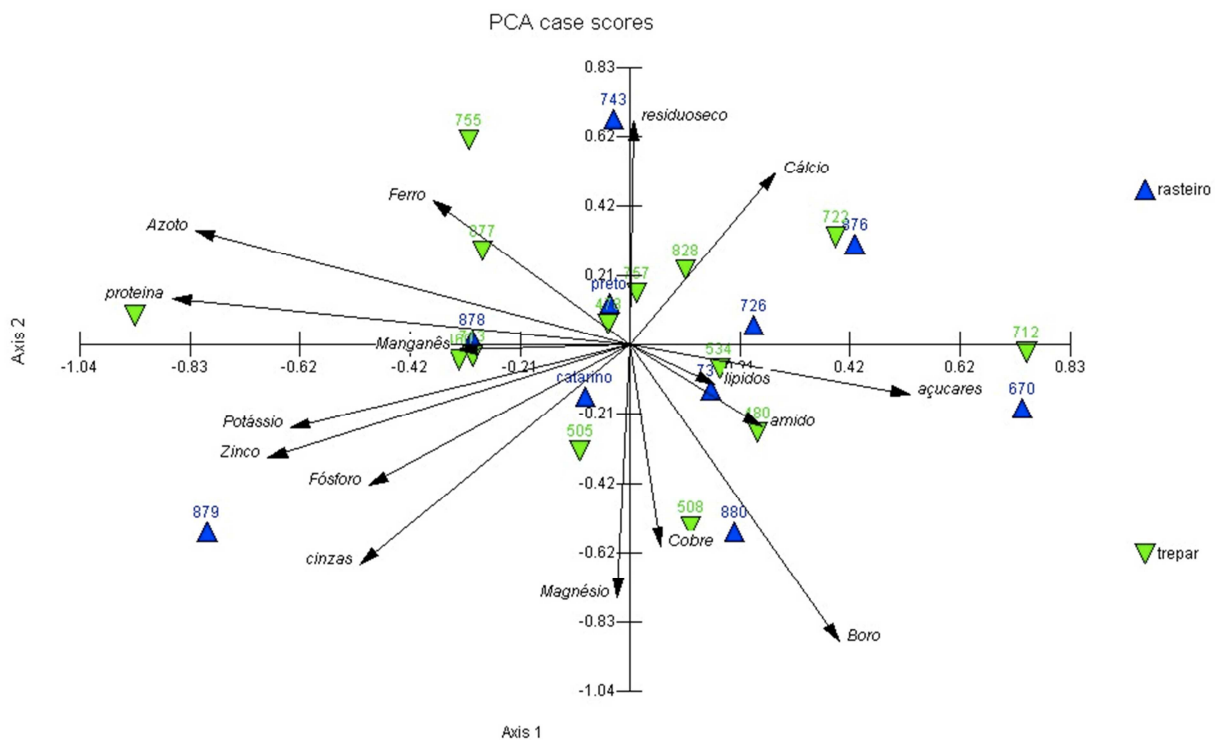


Figura 19. Representação dos auto-valores que demonstram de que forma todos os parâmetros nutricionais contribuem para a distribuição espacial dos ISOPs na análise PCA.

Os resultados mostraram que a variabilidade nutricional é explicada entre 6 componentes principais, sendo que apenas os 2 primeiros têm uma contribuição significativa para a distribuição espacial dos acessos, explicando 37,85% da variabilidade total. O primeiro eixo ou componente explica 22,84% e o segundo 15,00% de toda a variabilidade, com auto-valores (*eigenvalues*) de 3,65 e 2,40 respectivamente (Figura 20). A análise por PCA permitiu-nos agrupar os acessos de feijão em 3 *clusters*, cuja análise discriminante revelou um agrupamento 95,8% bem classificado por validação cruzada. Observa-se que os clusters formados não correspondem ao tipo de crescimento que agrupa as variedades

regionais de feijão em trepadores e rasteiros (Freitas [33]), dada a mistura de indivíduos trepadores com rasteiros em cada *cluster*.

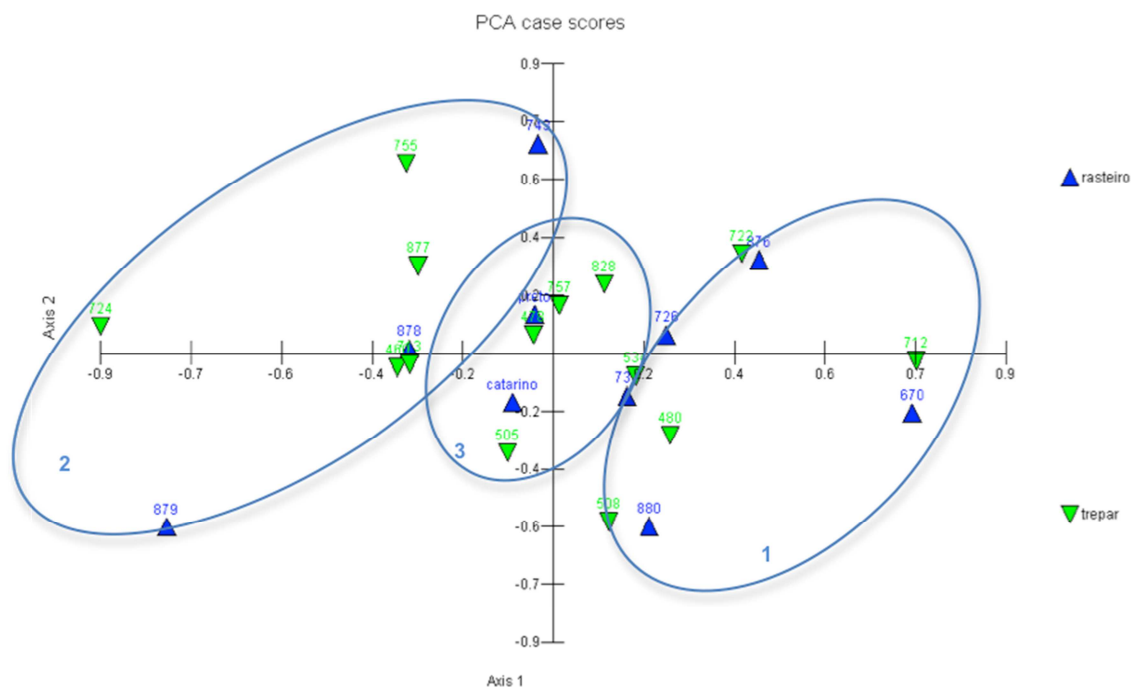


Figura 20. Análise efectuada com os resultados da caracterização nutricional dos componentes principais (PCA). Delimitação em círculo de 3 *clusters* distintos.

O grau de dissimilaridade foi calculado usando a distância generalizada de Mahalanobis para os dois componentes principais, através do programa estatístico SPSS v19. A 1ª função ou componente principal determinou a variação máxima dos grupos formados explicando 52,60% do total da variação, com uma correlação canónica de 0,87 e um auto-valor de 3,12, de acordo com os valores do coeficiente de função discriminante de 0,82 para o manganês. A segunda função explica 47,4% da variabilidade total, com uma correlação canónica de 0,86, auto-valor de 2,82 e coeficiente da função discriminante de -1,08 para o amido, 1,18 para a proteína, -0,94 para o zinco e 1,28 para o boro.

Segundo o teste multivariado de funções Wilks' lambda, temos a significância da função discriminante. Obteve-se funções altamente significativas ($p < 0,00$) para a divisão dos acessos em 3 *clusters*, com uma proporção de 6,40% e 26,20% em variação não-explicada para a primeira e segunda função, respectivamente. Dado o baixo valor de significância (p), o modelo apresentado na Figura 20 foi adequado para os dados apresentados. Para cada um dos 3 grupos de acessos identificados na Figura 20, representou-se a média de todas as variáveis no espaço multivariado (centróides) definido pelas variáveis no modelo apresentado. Através da distância generalizada de Mahalanobis entre dois pontos do espaço definido por variáveis correlacionadas, discriminou-se estatisticamente um centróide para cada um dos 3 *clusters* de acessos formados pelos

parâmetros em análise. Através da representação gráfica na Figura 21, podemos classificar os acessos mais próximos nutricionalmente dentro do grupo, que é onde a distância de Mahalanobis do acesso ao centróide é menor.

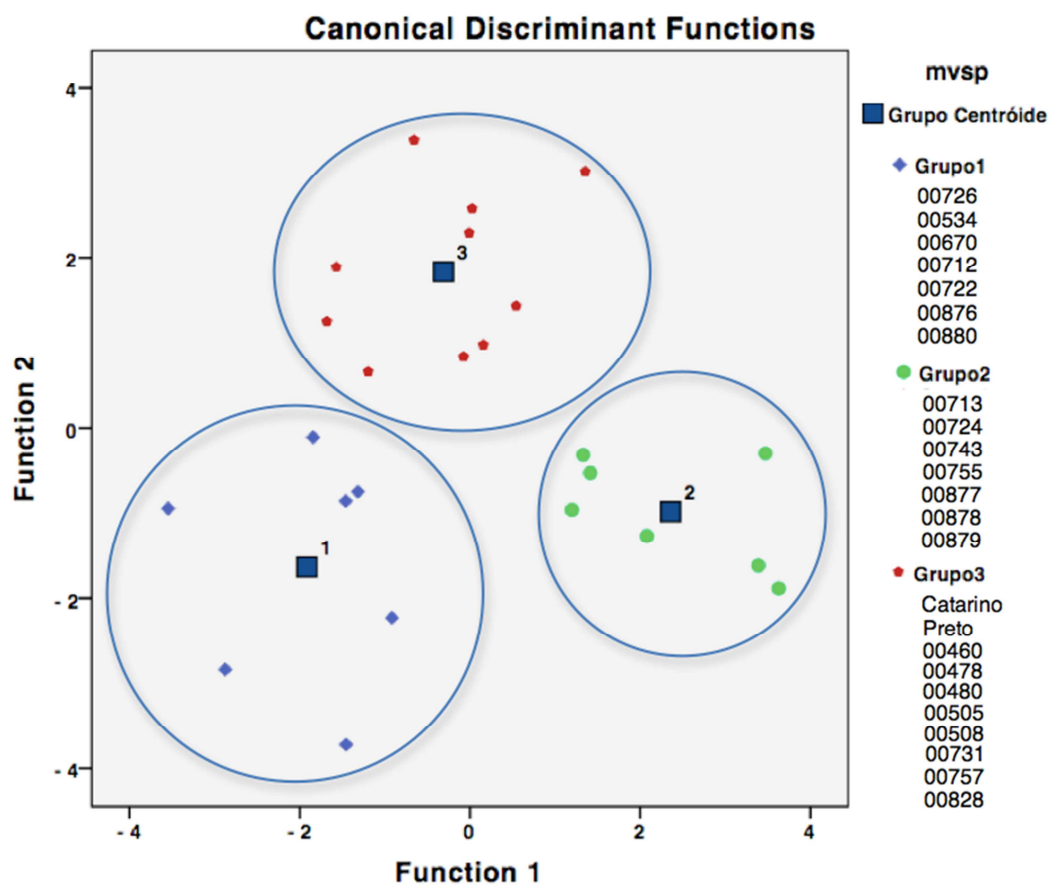


Figura 21. Representação gráfica das funções canônicas 1 e 2 para determinação dos centróides de cada cluster identificado na análise PCA.

Desta forma, podemos aferir os acessos que são representativos dos grupos em que se inserem: no *cluster* 1, o acesso que mais se aproxima do centro do grupo é o feijão trepador regional *vaginha* (ISOP 00534), no *cluster* 2 é o feijão rasteiro (ISOP 00743) e no *cluster* 3 é o feijão trepador regional *cornó de carneiro* (ISOP 00505). Através de abordagens estatísticas multivariadas, identificou-se 3 *clusters* representativos de toda a diversidade nutricional, cuja contribuição para a variabilidade através do teor de amido, proteína, manganês, zinco e boro provieram essencialmente dos 3 acessos acima mencionados.

Como os ISOPs em estudo se desenvolveram nas mesmas condições, minimizou-se a interferência ambiental no seu desenvolvimento. Desta forma, diferenças registradas entre *traits* não deverão resultar de factores ambientais, mas sim das propriedades genéticas inerentes a cada amostra, segundo Mandal [62] e Kokuszka [76], dado que com os resultados obtidos observou-se uma grande variabilidade nos parâmetros estudados.

5. Conclusão

O feijão comum tem a maior importância alimentar para os países com maior privação nutricional, como é o caso do continente Africano (Onwuliri [67]; Shimelis [12]; Shimelis [68]), como fonte de proteína alternativa à proteína alimentar. Em Portugal, o estudo nutricional do feijão tem vindo a ser realizado em complemento à avaliação de germoplasma (Rodiño [7]; Rodiño [16]; Coelho [15]). Este estudo permitiu-nos comparar as variedades regionais de feijão com outros trabalhos semelhantes, constituindo um factor indicativo na identificação de qual o acesso que mais se adequaria pela sua qualidade nutricional ao mercado regional ou nacional.

O teste *One-Way* ANOVA permitiu detectar os parâmetros nutricionais que apresentam maiores variações e diferem de si de forma significativa. Todos os acessos apresentaram boas características nutricionais, mas a proteína bruta e cinzas apresentaram significativamente a maior variância entre ISOPs, distinguindo-se estes dois parâmetros como principais indicadores de qualidade nutricional, de acordo com Sathe [52].

De acordo com os dados estatísticos e segundo Duranti [51], o *feijão vermelho* (ISOP 00724) tem as melhores características nutricionais, apresentando baixo índice glicémico e lipídico, relativamente ao teor proteico e mineral (cinzas) abundante. Como observou-se na Tabela II, este possuiu o maior índice de proteína bruta (29,69 g/100g MS), o segundo maior valor em cinzas (5,55 g/100g MS), teor de amido relativamente abundante (42,36 g/100g MS), contrastando com baixo teor em açúcares (3,99 g/100g MS) e lípidos totais (1,44 g/100g MS). O feijão vermelho apresentou um menor teor de humidade, ou seja, 93,55 g/100g MS de resíduo seco, evidenciando igualmente um carácter de qualidade (Hong [142]). Os feijões em estudo apresentaram valores de cinzas relativamente abundantes, como os ISOPs Preto e *feijão vermelho* (ISOP 00724), com potencial importância na contribuição mineral na dieta humana.

O desenvolvimento do modelo de calibração PLS para a previsão da composição centesimal por NIRS demonstrou a fiabilidade dos resultados obtidos para a proteína bruta e cinzas, tanto na validação interna ou externa. Os restantes parâmetros necessitam de ajustes na calibração do modelo por PLS, principalmente na previsão por NIRS do amido, visto haver muitas variações quer ao nível dos valores de referência como na calibração do modelo, dada provavelmente a variações físicas na farinha utilizada na sua determinação.

A análise comparativa dos parâmetros nutricionais, recorrendo às técnicas analíticas convencionais por *química molhada* e de NIRS, permitiu relacionar os parâmetros cinzas e proteína bruta como os principais critérios nutricionais para distinção das variedades regionais quanto à sua qualidade, ao diferirem significativamente relativamente aos parâmetros restantes.

Na análise PCA, identificou-se 3 *clusters* distintos e avaliou-se discriminantemente quais os acessos que mais se aproximariam do centro de cada *cluster*. O feijão trepador regional *vaginha* (ISOP 00534), o *feijão* rasteiro (ISOP 00743) e o feijão trepador regional *cornu de carneiro* (ISOP 00505) são nutricionalmente representativos dos restantes acessos no mesmo agrupamento.

O *feijão Filipe* (ISOP 00478) apresentou a maior capacidade de inibição da PPA, com cerca de 80% de actividade da faseolamina. De acordo a composição centesimal, este feijão poderá ser igualmente recomendado para o consumo diário, visto ser o acesso com maior capacidade de inibição da PPA, importante factor na saúde relacionada com o controlo da diabetes através da contribuição do baixo índice glicémico.

Os objectivos delineados neste trabalho foram cumpridos, através da análise da composição nutricional e anti-nutricional para a avaliação e tipagem dos centróides das variedades regionais de feijão que se adequariam às potenciais necessidades e procura no mercado. A introdução da técnica de previsão por NIRS permite criar um banco de informação nutricional e facultará rapidez e credibilidade nos resultados, através da construção de uma base de dados dos recursos genéticos locais.

6. Perspectivas futuras

Perspectivo, para futuro complemento do presente trabalho, o desenvolvimento e construção de um modelo de calibração mais robusto por NIRS-PLS, para uma previsão mais eficiente e exacta entre valores de referência e previstos. Para tal, alargar tanto o número de acessos regionais, como os parâmetros em estudo, de modo a melhor contribuir para a difusão da qualidade dos produtos regionais.

Deverá igualmente ser efectuado um estudo que englobasse a contribuição da faseolamina na alimentação, bem como incluir o teor de fibra alimentar ao presente estudo, de modo a podermos integrar estas farinhas de feijão em produtos para as mais diversas confecções, como potencial enriquecedor nutricional de produtos alimentares.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Guzmán-Maldonado SH, Acosta-Gallegos J, Paredes-López O. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Food Agric*, 2000; 80: 1874-1881.
- [2] Rios AO, Abreu CMP, Corrêa AD. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Cienc Tecnol Aliment*, 2003; 23: 39-45.
- [3] Pujolà M, Farreras A, Casañas F. Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem*, 2007; 102: 1034–1041.
- [4] Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil*, 2003; 252: 55–128.
- [5] Granito M, Frias J, Doblado R, Guerra M, Champ M, Vidal-Valverde C. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *Eur Food Res Technol*, 2002; 214: 226–231.
- [6] Bonett LP, Baumgartner MST, Klein AC, Silva LI. Compostos nutricionais e factores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Arq Ciênc Saúde Unipar*, 2007; 11 (3): 235-246.
- [7] Rodiño AP, Santalla M, Montero I, Casquero PA, De Ron AM. Diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Portugal. *Genet Resour Crop Ev*, 2001; 48: 409–417.
- [8] Schroeder HE, Gollasch S, Moore A, Tabe LM, Craig S, Hardie DC. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol*, 1995; 107: 1233-1239.
- [9] Celleno L, Tolaini MV, D'Amore A, Perricone NV, Preuss HG. A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. *Int J Med Sci*, 2007; 4: 45-52.
- [10] Boniglia C, Carratù B, Di Stefano S, Giammarioli S, Mosca M, Sanzini E. Lectins, trypsin and α -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris*. *Eur Food Res Technol*, 2008; 227: 689–693.
- [11] Obiro WC, Zhang T, Jiang B. Starch blocking stability of the *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor (α -AI1). *Am J Food Technol*, 2009; 4 (1): 9-19.

- [12] Shimelis EA, Rakshit SK. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *Food Sci Technol Int*, 2005; 38: 331–338.
- [13] Martins SR, Vences FJ, Sáenz de Miera LE, Barroso MR, Carnide V. RAPD analysis of genetic diversity among and within Portuguese landraces of common white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Sci Hortic*, 2006; 108: 133–142.
- [14] Stoilova T, Pereira G, Tavares M. Diversity in common bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) from Bulgaria and Portugal. *J Cent Eur Agr*, 2005; 6 (4): 443-448.
- [15] Coelho RC, Faria MA, Rocha J, Reis A, Oliveira MBPP, Nunes E. Assessing genetic variability in germplasm of *Phaseolus vulgaris* L. collected in Northern Portugal. *Sci Hortic*, 2009; 122: 333–338.
- [16] Rodiño AP, Santalla M, De Ron AM, Singh SP. A core collection of common bean from the Iberian peninsula. *Euphytica*, 2003; 131: 165–175.
- [17] Rodiño AP, Santalla M, González AM, De Ron AM, Singh SP. Novel genetic variation in common bean from the Iberian Peninsula. *Crop Sci*, 2006; 46: 2540-2546.
- [18] Pinheiro de Carvalho MÂA, Ganança JFT, Abreu I, Sousa NF, Marques dos Santos TM, Vieira MRC, Motto M. Evaluation of the maize (*Zea mays* L.) diversity on the Archipelago of Madeira. *Genet Resour Crop Evol*, 2007; 55: 221-233.
- [19] Turland NJ. *Flora of Madeira*, The Natural History Museum. JR Press & MJ Short, 1994. p. 155.
- [20] Camacho Villa TC, Maxted N, Scholten M, Ford-Lloyd B. Defining and identifying crop landraces. *Plant Genet Resour*, 2006; 3(3): 373–384.
- [21] Gepts P, Debouck DG. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), In: Schoonhoven AV & Voysest O, ed. *Common beans: Research for crop improvement*, CAB Int. Wallingford, Reino Unido e CIAT, Cali, Colombia, 1991. p. 7-53.
- [22] Bewley JD, Black M, Halmer P. *The encyclopedia of seeds: science, technology and uses*. CABI Publishing Series, 2006. pp. 32-36, 370-375.
- [23] Gepts, P. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Econ Bot*, 1990; 44 (3): 28-38
- [24] Langer RHM, Hill GD. *Agricultural plants*. Cambridge University Press, 1991, 2nd edition. p. 264-269

- [25] Pickersgill B, Chacón Sánchez MI, Debouck DG. Multiple domestications and their taxonomic consequences: the example of *Phaseolus vulgaris*. *Schriften zu Genetischen Ressourcen*. Bonn, 2003; 22: 71-83.
- [26] Brink M, Belay G. Cereals and pulses, *Plant resources of tropical Africa 1*, Prota editora, 2006. p.146-151.
- [27] Hidalgo R, Song L, Gepts P. The cultivated species of *Phaseolus vulgaris*. Fernández FO, Editors. Colombia: CIAT, 1986.
- [28] Freytag GF, Debouck DG. Taxonomy, Distribution, and Ecology of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoidae) in North America, Mexico and Central América, Brit Press, *Sida Botanical Miscellany*, Nº 23, 2002. p. 1-9, 36-42.
- [29] Hancock JF. *Plant evolution and the origin of crop species*. CABI Publishing Series, 2nd ed, 2004. p. 203-206
- [30] Graham PH, Ranalli P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crop Res*, 1997; 53: 131-146.
- [31] Ferrão JEM. *A aventura das plantas e os descobrimentos portugueses*, Instituto de Investigação Científica Tropical. Comissão Nacional para as Comemorações dos Descobrimentos Portugueses e Fundação Berardo, 1992. p. 94-95.
- [32] Lowe RT. *A manual flora of Madeira and the adjacent islands of Porto Santo and the Desertas: Dichlamydeae*. London: John van Voorst, 1, Paternoster row, Vol. I, 1868. p. 218-223.
- [33] Freitas G, Ganança JF, Nóbrega H, Nunes E, Costa G, Slaski JJ, Pinheiro de Carvalho MÂA. Morphological evaluation of common bean diversity on the Island of Madeira. *Genet Resour Crop Evol*, 2011. 58: 861-874.
- [34] Russell PJ, Wolfe SL, Hertz PE, Starr C, McMillan B. *Biology: The Dynamic Science*. Editora Cengage Learning EMEA, 2007. p. 783-786.
- [35] Costa GEA, Queiroz-Monici KS, Reis SMPM, Oliveira AC. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem*, 2006; 94: 327–330.
- [36] Tharanathan RN, Mahadevamma S. Grain legumes - a boon to human nutrition. *Trends Food Sci Tech*, 2003; 14: 507–518.
- [37] Mesquita FR, Corrêa AD, Abreu CMP, Lima RAZ, Abreu AFB. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. *Ciênc Agrotec*, Lavras, 2007; 31 (4): 1114-1121.

- [38] FAO (2008), Food and Agriculture Organization of United Nations: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (acesso em 05/09/09)
- [39] INE & IP. Estatísticas Agrícolas 2010. Instituto Nacional de Estatística, Ed., Lisboa: Estatísticas oficiais. 2011; ISSN 0079-4139
- [40] Shewry PR. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J Cereal Sci*, 2007; 46: 239–250
- [41] Sgarbieri VC, Whitaker JR. Physical, Chemical and Nutritional Properties of Common Bean (*Phaseolus*) Proteins, In: Chichester CO (Ed.), *Advances in food research*, *Advances in Food & Nutrition Research*, Academic Press, Volume 28, 1982. pp. 94-144.
- [42] Hillocks RJ, Madata CS, Chirwa R, Minja EM, Msolla S. *Phaseolus* bean improvement in Tanzânia, 1959–2005. *Euphytica*, 2006; 150: 215–231.
- [43] Blair MW, Astudillo C, Grusak MA, Graham R, Beebe SE. Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol Breeding*, 2009; 23: 197–207.
- [44] Kakade ML, Evans RJ. Nutritive value of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Brit J Nutr*, 1965; 19: 269-276.
- [45] Berrios JJ, Swanson BG, Cheong WA. Physico-chemical characterization of stored black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Res Int*, 1999; 32: 669-676.
- [46] Huesing JE, Shade RE, Chrispeels MJ, Murdock LL. α -Amylase inhibitor, not Phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiol*, 1991; 96: 993-996.
- [47] Lajolo FM, Genovese MI. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *J Agric Food Chem*, 2002; 50: 6592-6598.
- [48] Kaur S, Singh N, Sodhi NS, Rana JC. Diversity in properties of seed and flour of kidney bean germplasm. *Food Chem*, 2009; 117: 282-289.
- [49] Siddiq M, Ravi R, Harte JB, Dolan KD. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT - Food Sci Technol*, 2010; 43: 232-237.
- [50] Dzudie T, Scher J, Hardy J. Common bean flour as an extender in beef sausages. *J Food Eng*, 2002; 52: 143-147.
- [51] Duranti M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 2006; 77: 67–82.
- [52] Sathe SK. Dry bean protein functionality. *Crit Rev Biotechnol*, 2002; 22 (2): 175–223.

- [53] Navarra T. The encyclopedia of vitamins, minerals and supplements. Facts On File Inc. Ed., 2nd edition, 2004. p. 32–192.
- [54] Decreto-Lei n.º 54/2010. “D.R. série 1” 104 (Acesso em Agosto 16, 2011) 1842-1847.
- [55] World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. W. H. Organization Ed., 2nd ed., 2004.
- [56] Gelin JR, Forster S, Grafton KF, McClean PE, Rojas-Cifuentes GA. Analysis of seed zinc and other minerals in a recombinant inbred population of navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Sci*, 2007; 47: 1361-1366.
- [57] Bhatti N, Gilani AH, Nagra SA. Nutritional improvement of Lobia (*Phaseolus vulgaris*) by supplementation with poultry, mutton and beef meat. *Int J Food Sci Nutr*, 2001; 52: 521–526.
- [58] DeMan JM. Principles of food chemistry A Chapman & Hall food science book. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 3rd ed., 1999.
- [59] Baudoin JP, Maquet, A. Improvement of protein and amino acid contents in seeds of food legumes. A case study in *Phaseolus*. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 1999; 3 (4): 220–224.
- [60] Nielsen SS, Liener IE. Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol*, 1984; 74: 494-498.
- [61] Bressani R, Elías LG, Valiene AT. Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bet J Nutr*, 1963; 17: 69–78.
- [62] Mandal S, Mandal RK. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Curr Sci INDIA*, 2000; 79 (5): 576–589.
- [63] Fischer H, Chen L, Wallisch S. The evolution of angiosperm seed proteins: a methionine-rich legumin subfamily present in lower angiosperm clades. *J Mol Evol*, 1996; 43: 399-404.
- [64] Simonne AH, Simonne EH, Eitenmiller RR, Mills HA, Cresman CP. Could the dumas method replace the kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods? *J Sci Food Agric*, 1997; 73: 39-45.
- [65] Owusu-Apenten RK. Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing. Marcel Dekker Inc., Pennsylvania, 2002. p. 1-15.
- [66] Hui YH. Handbook of food science, technology, and engineering. Hui YH Editors. Taylor & Francis Group, Vol. I, 2006.

- [67] Onwuliri VA, Obu JA. Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* grown in northern Nigeria. *Food Chem*, 2002; 78: 1-7.
- [68] Shimelis EA, Meaza M, Rakshit SK. Physico-chemical properties, pasting behavior and functional characteristics of flours and starches from improved bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Agr Eng Int: the CIGR Ejournal*. Manuscript FP 05 015, Vol. VIII, 2006.
- [69] Shiga TM, Cordenunsi BR, Lajolo FM. Effect of cooking on non-starch polysaccharides of hard-to-cook beans. *Carbohydr Polym*, 2009; 76: 100–109.
- [70] Saha S, Singh G, Mahajan V, Gupta HS. Variability of nutritional and cooking quality in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a function of genotype. *Plant Foods Hum Nutr*, 2009; 64:174–180.
- [71] Institute of Medicine (US) Panel on Macronutrients, Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. The National Academies Press, 2005. p. 1320-1325.
- [72] Singh SP. Bean genetics. In: Schoonhoven AV & Voyses O, Editors. Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Int. Wallingford, Reino Unido e CIAT, Cali, Colômbia. 1991. p. 231-233.
- [73] Andrade CA, Patroni SM, Clemente E, Scapim CA. Produtividade e qualidade nutricional de cultivares de feijão em diferentes adubações. *Ciênc Agrotec*, 2004; 28 (5): 1077-1086.
- [74] Izydorczyk M. Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. In: Cui SW & Cui SW, Editors. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. Taylor & Francis, 2005. pp. 2-11.
- [75] Liu Q. Understanding Starches and Their Role in Foods. In: Cui SW & Cui SW, Editors. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. Taylor & Francis, 2005. p. 310-320.
- [76] Kozłowska H. Nutrition. In: Hedley CL, Editors. Carbohydrates in Grain Legume Seeds. CAB International, 2001. p. 61-67.
- [77] Kadlec P. Carbohydrate Chemistry. In: Hedley CL, Editors. Carbohydrates in Grain Legume Seeds. CAB International, 2001. p. 15-24.
- [78] Aguilera Y, Martín-Cabrejas MA, Benítez V, Mollá E, López-Andréu FJ, Esteba RM. Changes in carbohydrate fraction during dehydration process of common legumes. *J Food Compos Anal*, 2009; 22: 678–683.

- [79] Amaral LI, Gaspar M, Costa PM, Aidar MP, Buckeridge MS. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, 2007; 34 (4): 425-431.
- [80] Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. Resistant Starch — a review. *Compr Rev Food Sci F*, 2006; 5: 1-17.
- [81] Sinnott ML. *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry: Structure and Mechanism*. The Royal Society of Chemistry, 2007. p. 213-223.
- [82] Sawazaki HE, Teixeira JP, Machado De Moraes R, Bulisani EA. Modificações bioquímicas e físicas em grãos de feijão durante o armazenamento. *Bragantia*, 1985; 44 (1): 375-390.
- [83] Eyearu R, Shrestha AK, Arcot J. Effect of various processing techniques on digestibility of starch in red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) and two varieties of peas (*Pisum sativum*). *Food Res Int*, 2009; 42: 956-962.
- [84] Vargas-Torres A, Osorio-Díaz P, Islas-Hernández JJ, Tovar J, Paredes-López O, Bello-Pérez LA. Starch digestibility of five cooked black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J Food Compos Anal*, 2004; 17: 605-612.
- [85] Chung HJ, Liu Q, Pauls KP, Fan MZ, Yada R. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. *Food Res Int*, 2008; 41: 869-875.
- [86] Roe JH. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J Biol Chem*, 1955; 212: 335–343.
- [87] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956; 28: 350–356.
- [88] Laurentin A, Edwards CA. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Anal Biochem*, 2003; 315: 143-145.
- [89] Bailey RW. The reaction of pentoses with anthrone. *Biochem J*, 1958; 68 (4): 669–672.
- [90] Beck DJ, Bibby BG. A Modified anthrone colorimetric technique for use in investigations related to the cariogenicity of foodstuffs. *J Dent Res*, 1961; 40 (1): 161-170.
- [91] Colvin HW, Attebery JT, Ivy JT. Comparison of the anthrone reagent and a copper-reduction method for determining blood sugar in calves. *J Dairy Sci*, 1961; 44 (11): 2081-2088.
- [92] Brooks JR, Griffin VK, Kattan MW. A modified method for total carbohydrate analysis of glucose syrups, maltodextrins, and other starch hydrolysis products. *Cereal Chem*, 1986; 63 (5): 465-466.

- [93] Dreywood R. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind and Eng Chem Anal Ed*, 1946; 18: 499.
- [94] Altamirano-Hernández J, López MG, Acosta-Gallegos JA, Fariás-Rodríguez R, Peña-Cabriales JJ. Influence of soluble sugars on seed quality in nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): the case of trehalose. *Crop Sci*, 2007; 47: 1193-1205.
- [95] Pomeranz Y, Meloan CE. *Food Analysis: Theory and Practice*. AN Aspen Publication, 3rd ed., 2000.
- [96] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957; 226: 497–509.
- [97] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959; 37: 911-917.
- [98] Wrolstad RE, Decker EA, Schwartz SJ, Sporns P. *Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrate*. John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [99] Iverson SJ, Lang SL, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids*, 2001; 36 (11), 1283-1287.
- [100] Shahidi F, Wanasundara P. Extraction and Analysis of Lipids. In: Akoh CC & Min DB, Editors. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. CRC Press Taylor & Francis Group, 3rd ed., 2008. p. 125-130.
- [101] Hermida M, Rodriguez R, Rodriguez-Otero JL. Determination of moisture, starch, protein, and fat in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by near infrared spectroscopy. *J AOAC Int*, 2006; 89 (4): 1039-1041.
- [102] Yoshida H, Tomiyama Y. Characterization In The Fatty Acid Distributions Of Triacylglycerols And Phospholipids In Kidney Beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J Food Lipids*, 2005; 12: 169-180.
- [103] Yoshida H, Tomiyama Y, Kita S, Mizushina Y. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur J Lipid Sci Technol*, 2005; 107: 307-315.
- [104] Marzo F, Alonso R, Urdaneta E, Arricibita FJ, Ibanez F. Nutritional quality of extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) and its effects on growth and skeletal muscle nitrogen fractions in rats. *J Anim Sci*, 2002; 80: 875-879.
- [105] Burbano C, Muzquiz M, Ayet G, Cuadrado C, Pedrosa MM. Evaluation of antinutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris*. *J Sci Food Agric*, 1999; 79:1468-1472.

- [106] Antunes PL, Bilhalva AB, Elias MC, Soares GJD. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2. Rev Bras de Agrociência, 1995; 1 (1): 12-18.
- [107] Genovese MI, Lajolo FM. Actividade inibitória de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris*): avaliação crítica dos métodos de determinação. Arch Latinoam Nutr, 2001; 51 (4): 386–394.
- [108] Mejia EG, Valadez-Vega MC, Reynoso-Camacho R, Loarca-Pina G. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. Plant Food Hum Nutr, 2005; 60: 137-145.
- [109] Shi J, Xue SJ, Kakuda Y, Ilic S, Kim D. Isolation and characterization of lectins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Process Biochem, 2007; 42: 1436-1442.
- [110] Mattar da Silva MC, Mello LV, Coutinho MV, Rigden DJ, Neshich G, Chrispeels MJ, Grossi-de-Sá MF. Mutants of common bean alpha-amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to alpha-amylases. Pesq Agropec Bras, 2004; 39 (3): 201-208.
- [111] Svensson B, Fukuda K, Nielsen PK, Bønsager BC. Proteinaceous α -amylase inhibitors. Biochem Bioph Acta, 2004; 1696: 145–156.
- [112] Le Berre-Anton V, Bompard-Gilles C, Payan F, Rouge P. Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Biochem Bioph Acta, 1997; 1343: 31–40.
- [113] Gibbs BF, Alli I. Characterization of a purified α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Food Res Int, 1998; 31 (3): 217-225.
- [114] Lee SC, Gepts PL, Whitaker JR. Protein structures of common bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitors. J Agric Food Chem, 2002; 50 (22): 6618-6627.
- [115] Mosca M, Boniglia C, Carratù B, Giammarioli S, Nera V, Sanzini E. Determination of α -amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. Anal Chim Acta, 2008; 617: 192–195.
- [116] Smith AD. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology Revised Edition. Oxford University Press, 2000. p. 49.
- [117] Desseaux V, Koukiekolo R, Moreau Y, Santimone M, Marchis-Mouren G. Mechanism of porcine pancreatic α -amylase: inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by various inhibitors. Biologia, 2002; 57 (11): 163-170.

- [118] Xie SX, Liu Q, Cui SW. Starch modifications and applications. In: Cui S W, Editor. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. CRC Press, 2005. p.391.
- [119] Moreno J, Altabella T, Chrispeels MJ. Characterization of α -amylase-inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol, 1990; 92: 703-709.
- [120] Nasi A, Picariello G, Ferranti P. Review of Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. J Proteomics, 2009; 72: 527-538.
- [121] Valencia-Jiménez A, Valencia JWA, Grossi-de-Sá MF. Activity of α -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive α -amylases of the coffee berry borer. J Agric Food Chem, 2008; 56: 2315–2320.
- [122] Le Berre-Anton V, Nahoum V, Payan F, Rougé P. Molecular basis for the specific binding of different α -amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of α -amylase. Plant Physiol Biochem, 2000; 38 (9): 657-665.
- [123] Santimone M, Koukiekolo R, Moreau Y, Le Berre V, Rougé P, Marchis-Mouren G, Desseaux V. Porcine pancreatic α -amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (α -AI1) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex. Biochem Bioph Acta, 2004; 1696: 181– 190.
- [124] Pueyo JJ, Hunt DC, Chrispeels MJ. Activation of Bean (*Phaseolus vulgaris*) α -Amylase Inhibitor Requires Proteolytic Processing of the Proprotein. Plant Physiol, 1993; 101: 1341-1348.
- [125] Moreno J, Chrispeels MJ. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 7885-7889.
- [126] Koukiekolo R, Le Berre-Anton V, Desseaux V, Moreau Y, Rougé P, Marchis-Mouren G. Mechanism of porcine pancreatic α -amylase Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor and comparison with that by acarbose. Eur J Biochem, 1999; 265: 20-26.
- [127] Arnaut L, Formosinho S & Burrows H. Chemical kinetics from molecular structure to chemical reactivity. Elsevier, Netherlands, 2007. p. 361-372.
- [128] Layer P, Zinsmeister AR, DiMagno EP. Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. Gastroenterology, 1986; 91 (1): 41-48.
- [129] Chokshi D. Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. Food Chem Toxicol, 2007; 45: 32–40.

- [130] Workman J, Weyer L. Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy. CRC Press, 2008.
- [131] Burns DA, Ciurczak EW. Handbook of Near-Infrared Analysis. Marcel Dekker Inc. Editor., 2nd ed., 2001. p. 822.
- [132] Schimleck LR. Near Infrared Spectroscopy: a rapid, non-destructive method for measuring wood properties and its application to tree breeding. NZ J For Sci (in review), 2007.
- [133] Hacisalihoglu G, Larbi B, Settles AM. Near-infrared reflectance spectroscopy predicts protein, starch, and seed weight in intact seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Agric Food Chem, 2010; 58 (2): 702-706.
- [134] Osborne BG. Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis. In: Meyers RA, Editor. Encyclopedia of Analytical Chemistry Applications - Theory, and Instrumentation. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
- [135] Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. Near-Infrared Spectroscopy - Principles, Instruments, Applications. WILEY-VCH Press, 1st ed., 2002.
- [136] Berzaghi P, Dalle Zotte A, Jansson LM, Andrighetto I. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. Poultry Sci, 2005; 84: 128–136.
- [137] Nicolai BM, Beullens K, Bobelyn E, Peirs A, Saeys W, Theron KI. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. Postharvest Biol Tec, 2007; 46: 99-118.
- [138] Fernández-Ahumada E, Garrido-Varo A, Guerrero JE, Pérez-Marín D, Fearn T. Taking NIR calibrations of feed compounds from the laboratory to the process: calibration transfer between predispersive and postdispersive instruments. J Agric Food Chem, 2008; 56: 10135-10141.
- [139] Williams P. Grains and Seeds. In: Ozaki Y, McClure WF & Christy A A, Editors. Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. Wiley-Interscience, 2007. p. 165-217.
- [140] Gillon D, Houssard C, Joffre R. Using near-infrared reflectance spectroscopy to predict carbon, nitrogen and phosphorus content in heterogeneous plant material. Oecologia, 1999; 118: 173-182.
- [141] Hermida M, Rodriguez R, Rodriguez-Otero JL. Determination of moisture, starch, protein, and fat in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by near infrared Spectroscopy. J AOAC Int, 2006; 89 (4): 1039-1041.

- [142] Hong TD, Ellis RH. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin No. 1,. IPGRI Publications, UK., 1996. p. 22-25.
- [143] Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D, Larinde M. (2006). Manual of seed handling in genebanks, (pp. 28-38). Handbooks for Genebanks No. 8, Bioersity International, Rome, Italy.
- [144] AOAC, Official methods of analysis, Method 925.10 Solids (total) and Moisture in Flour, AOAC International Publisher, 2005.
- [145] NP 518:1986 – Determinação do teor de cinza em cereais e leguminosas.
- [146] Humphreys FR, Kelly J. (1961). A method for the determination of starch in wood. Anal Chim Acta, 1961; 24: 66-70.
- [147] McCready MR, Guggols J, Silvierra V, Owens SH. Determination of starch and amylose in vegetables. Anal Chem, 1950; 22: 1156-1158.
- [148] Hodge JE, Hofreiter BT. Analysis and Preparation of Sugars. In: Whistler RL & Be Miller JN, Editors. Methods in Carbohydrate Chemistry. Academic Press, New York, 6th ed., 1962. p. 356-378.
- [149] AOAC, Official methods of analysis, Method 945.18-B Determination of Protein Content in Food. AOAC International Publisher, 2000.
- [150] Corporation, L. A guide to Kjeldahl nitrogen determination methods and apparatus. Labconco Corporation, 1998.
- [151] Temminghoff EE, Houba VJ. Plant Analysis Procedures. (Temminghoff EE & Houba VJ, Editors. London: Kluwer Academic Publishers, 2nd ed., 2004.
- [152] Makkar HP, Siddhuraju P, Becker K. α -amylase inhibitor. In: Makkar HP, Siddhuraju P & Becker K, Editors. Methods in Molecular Biology: Plant Secondary Metabolites. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, Vol. 393, 2007. p. 11-14.
- [153] Bernfeld P. Amylases alpha and beta. Meth Enzymol, 1955; 1: 149-158.
- [154] Oomah BD, Blanchard C, Balasubramanian P. Phytic acid, phytase, minerals, and antioxidant activity in canadian dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. J Agric Food Chem, 2008; 56: 11312-11319.
- [155] Osborne BG. Flours and Breads. In: Ozaki Y, McClure WF & Christy AA, Editors. Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. Wiley-Interscience, 2007. p. 289.
- [156] Baks T, Janssen AE, Boom RM. A kinetic model to explain the maximum in α -amylase activity measurements in the presence of small carbohydrates. Biotechnol Bioeng, 2006; 94 (3): 431-440.

Anexo 1. Dados bibliográficos para cinzas e minerais em feijão comum

Referência	Estudo	Cinzas (g/100g MS)	Macronutrientes (g/100g)				Micronutrientes (mg/100g)				
			Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Boro
Mesquita [37]	Composição química e digestibilidade proteica de linhagens de feijão.	3,00-4,90	0,45-0,72	1,51-2,48	0,03-0,28	0,18-0,34	7,14-12,69	1,14-1,77	3,67-6,99	1,49-2,89	-
Granito [5]	Melhoria na qualidade nutricional de feijão pela fermentação natural.	3,80	0,44	1,07	0,19	0,16	6,31	-	2,82	-	-
Shimelis [12]	Propriedades físico-químicas de variedades melhoradas de feijão da Etiópia.	2,86-4,26	0,02	-	0,07-0,19	-	6,23-8,40	-	1,54-2,89	-	-
Onwuliri [67]	Lípidos e outros constituintes do feijão do norte da Nigéria	2,00-3,10	0,25-0,36	1,96-2,32	0,09-0,18	0,18-0,30	8,46-35,10	6,20-32,50	2,46-2,75	0,09-1,50	-
Oomah [154]	Ácido fítico, fitase, minerais e actividade antioxidante do feijão do Canadá.	-	0,50-0,66	1,62-1,95	0,08-0,20	0,15-0,21	2,83-6,66	0,01-0,88	1,80-2,83	1,08-1,94	0,94-1,37
Guzmán-Maldonado [1]	Conteúdo proteico e mineral de feijão em duas regiões do México.	-	-	-	0,18-0,19	-	9,30-10,90	-	1,66-1,74	-	-
Saha [70]	Variedade da qualidade nutricional e de confecção do feijão como função do genótipo	-	0,36-0,49	0,98-1,29	-	-	7,94-13,76	0,18-0,75	2,51-4,48	1,11-3,94	-
	Visão global	2,00-4,90	0,015-0,72	0,98-2,48	0,03-0,28	0,15-0,34	2,83-13,76	0,01-32,50	1,54-6,99	0,09-3,94	0,94-1,37

Anexo 2. Teor de macro e micronutrientes que compõem as cinzas de feijão comum (dados obtidos pelo núcleo de Análises de Solos e Plantas, Camacha).

ISOP	Macronutrientes (g/100g)					Micronutrientes (mg/100g)				
	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Boro
460	3,83	0,42	1,70	0,02	0,18	6,00	1,00	2,70	1,20	1,60
478	3,67	0,41	1,55	0,02	0,17	6,00	1,20	3,00	1,60	1,80
480	3,00	0,35	1,70	0,02	0,17	6,20	1,30	3,30	1,40	1,80
505	3,67	0,50	1,55	0,02	0,17	6,50	1,30	3,50	1,50	2,00
508	3,33	0,51	1,50	0,02	0,18	6,80	1,30	2,80	1,60	1,70
534	3,17	0,44	1,60	0,02	0,14	5,50	1,40	2,90	1,10	1,90
670	3,00	0,43	1,30	0,02	0,18	6,40	1,30	2,50	1,50	1,70
712	3,00	0,35	1,40	0,02	0,17	6,50	1,10	3,00	1,00	1,80
713	3,83	0,41	1,55	0,01	0,17	5,00	1,00	2,80	1,30	1,50
722	3,17	0,30	1,45	0,02	0,15	8,50	1,40	5,00	1,50	1,40
724	4,83	0,41	1,65	0,02	0,17	6,50	0,90	2,80	0,90	1,70
726	3,50	0,37	1,55	0,02	0,17	7,00	1,00	3,40	1,30	1,70
731	3,50	0,37	1,55	0,01	0,17	5,50	1,20	3,10	1,40	1,40
743	4,33	0,43	1,60	0,02	0,15	6,00	1,00	2,70	1,50	1,20
755	4,17	0,44	1,55	0,02	0,15	10,00	1,00	2,60	1,50	1,40
757	3,67	0,44	1,65	0,02	0,14	6,50	1,20	2,90	1,00	1,80
828	3,83	0,35	1,65	0,02	0,17	6,00	1,10	2,30	1,30	1,50
876	3,17	0,43	1,40	0,02	0,15	5,50	0,90	3,30	1,60	1,60
877	3,67	0,52	1,50	0,02	0,12	6,50	1,10	3,80	3,80	1,60
878	3,67	0,46	1,50	0,01	0,17	4,50	1,00	3,60	1,90	1,30
879	4,17	0,58	1,80	0,01	0,18	6,00	1,10	4,00	2,20	1,70
880	3,33	0,43	1,60	0,01	0,17	4,50	1,20	3,10	1,80	1,80
Catarino	3,50	0,52	1,75	0,02	0,18	6,00	1,10	2,90	1,90	1,80
Preto	3,00	0,42	1,55	0,02	0,15	8,00	1,00	2,90	1,20	1,60

Anexo 3. Teste não-paramétrico de kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade dos dados centesimais e anti-nutricionais dos acessos em estudo, pelo programa SPSS v19.0.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		açúcares	amido	cinzas	lipidos	proteína
N		24	24	24	24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,9767	39,6009	4,7560	1,9731	22,4526
	Std. Deviation	,58445	7,20999	,46881	,35564	2,70323
Most Extreme Differences	Absolute	,104	,111	,119	,120	,114
	Positive	,104	,073	,119	,120	,114
	Negative	-,042	-,111	-,093	-,104	-,076
Kolmogorov-Smirnov Z		,510	,543	,583	,587	,558
Asymp. Sig. (2-tailed)		,958	,930	,886	,881	,915

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		residuoseco	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio
N		24	24	24	24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	91,5497	3,58375	,42875	1,56667	,01792
	Std. Deviation	1,17862	,468251	,064560	,114841	,004149
Most Extreme Differences	Absolute	,111	,135	,181	,151	,484
	Positive	,094	,135	,181	,141	,308
	Negative	-,111	-,106	-,136	-,151	-,484
Kolmogorov-Smirnov Z		,543	,663	,886	,738	2,371
Asymp. Sig. (2-tailed)		,929	,772	,413	,647	,000

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês
N		24	24	24	24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,16333	,006329	,001129	,003121	,001542
	Std. Deviation	,015788	,0011976	,0001488	,0005710	,0005717
Most Extreme Differences	Absolute	,330	,235	,182	,181	,251
	Positive	,146	,235	,182	,181	,251
	Negative	-,330	-,142	-,124	-,106	-,131
Kolmogorov-Smirnov Z		1,618	1,151	,893	,888	1,230
Asymp. Sig. (2-tailed)		,011	,141	,403	,410	,097

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Boro	inibição
N		24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,001637	45,2138
	Std. Deviation	,0001974	15,99748
Most Extreme Differences	Absolute	,166	,237
	Positive	,122	,237
	Negative	-,166	-,110
Kolmogorov-Smirnov Z		,813	1,163
Asymp. Sig. (2-tailed)		,524	,134

a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

Anexo 4. Teste comparação múltipla Tukey em avaliação centesimal e anti-nutricional, por SPSS v19.0.

Parâmetro ISOP	Açúcares solúveis	Amido	Cinzas	Lípidos totais	Proteína bruta	Resíduo Seco	Inibição PPA por α -AI
00460	3,73 ± 0,08 cde	37,22 ± 1,98 cd	4,74 ± 0,16 fgh	2,32 ± 0,60 ab	27,21 ± 0,07 l	90,84 ± 0,82 abc	65,95 ± 0,2 hi
00478	3,11 ± 0,03 a	42,71 ± 0,18 defgh	4,61 ± 0,01 def	2,07 ± 0,19 ab	24,41 ± 0,16 ij	90,13 ± 3,57 abc	80,24 ± 5,93 j
00480	4,02 ± 0,02 efg	37,83 ± 3,56 de	5,32 ± 0,02 j	2,86 ± 0,09 b	20,13 ± 0,04 c	91,68 ± 1,44 abc	45,50 ± 4,0 fg
00505	4,45 ± 0,03 hij	37,39 ± 3,76 cd	5,36 ± 0,05 j	2,34 ± 0,34 ab	24,02 ± 0,06 hi	91,55 ± 0,40 abc	35,88 ± 4,38 bcdef
00508	3,82 ± 0,07 def	39,95 ± 1,47 defg	4,65 ± 0,00 efg	2,42 ± 0,08 ab	21,57 ± 0,03 e	89,19 ± 0,21 a	45,72 ± 2,37 fg
00534	3,59 ± 0,04 bcd	42,67 ± 1,46 defgh	4,61 ± 0,02 def	1,61 ± 0,10 a	20,04 ± 0,28 c	89,60 ± 2,45 ab	39,90 ± 0,22 cdef
00670	4,73 ± 0,03 jk	49,06 ± 3,63 hi	4,07 ± 0,04 b	1,64 ± 0,31 a	19,30 ± 0,24 b	92,63 ± 0,49 abc	38,51 ± 1,76 bcdef
00712	5,35 ± 0,02 l	52,65 ± 2,18 i	4,54 ± 0,01 cde	2,09 ± 0,22 ab	18,55 ± 0,17 a	92,74 ± 0,11 abc	56,42 ± 1,84 gh
00713	2,97 ± 0,09 a	36,00 ± 2,10 bcd	4,97 ± 0,03 i	1,60 ± 0,23 a	23,33 ± 0,10 g	91,35 ± 0,16 abc	28,03 ± 2,63 abc
00722	3,27 ± 0,07 ab	40,42 ± 0,31 defg	4,40 ± 0,02 c	1,57 ± 0,54 a	20,02 ± 0,16 c	91,07 ± 0,95 abc	37,14 ± 0,40 bcdef
00724	3,99 ± 0,09 efg	42,36 ± 1,81 defgh	5,55 ± 0,03 kl	1,44 ± 0,16 a	29,69 ± 0,06 m	93,55 ± 0,51 c	34,73 ± 3,82 bcdef
00726	4,44 ± 0,32 hij	41,99 ± 3,81 defgh	4,82 ± 0,08 ghi	1,80 ± 0,36 a	21,51 ± 0,12 e	90,90 ± 0,14 abc	74,01 ± 4,02 ij
00731	4,31 ± 0,07 ghi	35,34 ± 1,82 bcd	4,86 ± 0,02 hi	1,97 ± 0,45 ab	20,87 ± 0,24 d	92,20 ± 1,21 abc	65,89 ± 1,06 hi
00743	4,30 ± 0,24 ghi	26,91 ± 1,48 a	3,82 ± 0,03 a	2,40 ± 0,25 ab	21,67 ± 0,21 e	92,64 ± 1,22 abc	73,65 ± 2,13 ij
00755	3,44 ± 0,03 bc	45,51 ± 3,16 ghi	4,36 ± 0,01 c	2,06 ± 0,14 ab	25,76 ± 0,10 kl	92,42 ± 0,26 abc	43,48 ± 3,09 ef
00757	3,80 ± 0,05 def	29,33 ± 0,88 ab	4,43 ± 0,05 cd	2,03 ± 0,06 ab	22,49 ± 0,04 f	91,94 ± 1,09 abc	40,60 ± 1,32 def
00828	4,80 ± 0,11 k	35,73 ± 0,89 bcd	4,54 ± 0,02 cde	1,48 ± 0,27 a	23,47 ± 0,09 gh	91,61 ± 0,16 abc	27,20 ± 4,34 ab
00876*	4,13 ± 0,10 fgh	46,98 ± 3,48 ghi	4,10 ± 0,04 b	1,90 ± 0,06 ab	19,24 ± 0,36 b	92,65 ± 1,01 abc	42,26 ± 2,59 def
00877*	3,57 ± 0,06 bcd	45,14 ± 2,35 efgh	4,66 ± 0,11 efg	2,10 ± 0,12 ab	22,30 ± 0,15 f	92,87 ± 0,018 bc	20,28 ± 0,80 a
00878*	3,70 ± 0,04 cde	23,40 ± 0,45 a	4,79 ± 0,02 fghi	2,12 ± 0,32 ab	23,33 ± 0,17 g	91,02 ± 0,82 abc	31,53 ± 0,32 abcde
00879*	3,30 ± 0,08 ab	46,33 ± 1,50 ghi	5,43 ± 0,03 jk	1,57 ± 0,29 a	24,95 ± 0,05 j	90,05 ± 1,30 abc	44,68 ± 3,43 fg
00880*	4,63 ± 0,09 ijk	47,10 ± 1,93 ghi	4,96 ± 0,16 i	2,22 ± 0,20 ab	20,49 ± 0,20 cd	89,81 ± 0,88 ab	30,72 ± 0,62 abcd
Catarino**	4,19 ± 0,07 gh	30,08 ± 3,57 abc	4,89 ± 0,01 hi	1,69 ± 0,76 a	20,58 ± 0,50 cd	92,75 ± 0,46 abc	42,13 ± 0,98 def
Preto**	3,82 ± 0,09 def	38,30 ± 1,94 def	5,67 ± 0,01 l	2,06 ± 0,29 ab	23,93 ± 0,09 hi	92,07 ± 0,66 abc	40,69 ± 5,62 def

* Padrões; ** Comerciais

Nota: valores apresentados sob a forma de média ± desvio padrão de três determinações independentes
a-p: médias com diferentes caracteres diferem significativamente ao longo da coluna ($p < 0,05$)