

ANÁLISE DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*)

**Núbia Moura RIBEIRO (1); Wagna Piler C. SANTOS (2); Dayane Santos CONCEICAO (3);
Caique Beijos da PAIXÃO (4); Reginaldo J. GOMES NETO (5).**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA),
Rua Emídio dos Santos s/n, Barbalho 40301-015, Salvador, BA – Brasil,
E-mail: (1) nubia@ifba.edu.br; (2) jolurswp@gmail.com; (3) dadaysc@hotmail.com;
(4) kiq_clarinet7@hotmail.com; (5) reginaldo_net@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho apresenta a análise de constituintes químicos de uma leguminosa largamente empregada na culinária nordestina: o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Foram determinados os teores de compostos fenólicos totais e de flavonóides através de métodos espectroscópicos na região do ultravioleta e visível, e foram feitas inferências quanto à relação entre o teor de compostos fenólicos totais e os fatores antinutricionais. Também foi realizada a especiação de ferro e analisada a bioacessibilidade do ferro. Os resultados permitem concluir que, como apenas cerca de 10% dos compostos fenólicos presentes nos extratos são flavonóides, possivelmente a maior parte de compostos fenólicos compõem-se de fitatos ou taninos, que são considerados agentes anti-nutricionais. No que se refere ao estudo da bioacessibilidade de ferro II, observou-se que o resultado obtido encontra-se abaixo dos valores de bioacessibilidade de ferro total (37 %) determinados em estudos anteriores.

Palavras-chave: feijão-de-corda, fenóis, flavonoides, bioacessibilidade, especiação, ferro

1. 1. INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) constitui a base alimentar de diversas populações rurais brasileiras devido ao seu elevado valor nutritivo a nível protéico e energético, e à sua fácil adaptação a solos de baixa fertilidade e com períodos de seca prolongada. No Nordeste do país, o consumo do feijão-de-corda ocorre tanto na fase de plena maturação de seus grãos quanto em fase anterior, quando o produto é denominado "feijão verde", largamente usado na culinária regional.

Este tipo de feijão é uma planta da família das leguminosas (*Fabaceae*), subfamília papilionoídea (*Faboideae*). Há dúvidas quanto a sua origem, embora se acredite que seja uma planta originária da África Tropical. Possui várias subespécies e é utilizada também como forragem especialmente nutritiva e como adubo verde.

O feijão-de-corda, como outras leguminosas, apresenta substâncias polifenólicas na composição de seus grãos. Alguns autores atribuem características antinutricionais à presença de polifenóis, embora outros autores destaquem a atividade antioxidante decorrente da presença deste tipo de substância (ASSIS, NAHAS, 1999; GONÇALVES, 2008).

O estudo da biodisponibilidade de nutrientes em importantes alimentos no cenário regional, a exemplo das leguminosas, bem como o desenvolvimento de trabalhos de investigação que visem estimar a biodisponibilidade de nutrientes, tais como os elementos essenciais, são importantes para assegurar a segurança alimentar da dieta, uma vez que leguminosas estão presentes na alimentação diária do brasileiro e o consumo desses alimentos deve ser incentivado no Brasil. Os métodos empregados para estimar a biodisponibilidade de elementos contam com diferentes abordagens, podendo empregar testes *in vivo* ou *in vitro* (NAYAK e NAIR, 2003). Os testes *in vivo* utilizam cobaias e humanos para simular uma exposição ao material a ser investigado e costumam ser bastante laboriosos. Já os testes *in vitro*, objetos deste trabalho baseiam-se na extração seletiva ou simulam a fisiologia do trato gastrointestinal. Muitos métodos *in vitro* vêm sendo empregados para estimar a bioacessibilidade de determinadas espécies químicas, dentre eles se

encontra o SBET (*Simple Bioaccessibility Extraction*), proposto pelo Consórcio para Pesquisas em Solubilidade e Biodisponibilidade (SBRC). É um método utilizado para simular a mobilização das substâncias nas condições gástricas do estômago, desconsiderando o compartimento intestinal. Como apenas simula a fase gástrica, fornece, em geral, resultados superestimados de bioacessibilidade, devido ao baixo pH do meio e à ausência de uma fase intestinal. O desenvolvimento, validação e padronização destes métodos é uma área que ainda demanda estudos (INTAWONGSE, DEAN, 2006).

O ferro é um importante nutriente para a dieta humana, estando presente em leguminosas como macro elemento. Sua absorção pelo organismo humano dar-se sob a forma de Fe^{2+} , sendo necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas que visem a sua especiação do mesmo quanto ao número de oxidação sob condições gástricas.

O método então escolhido para especiação do Ferro foi a o-fenantrolina, uma vez que a o-fenantrolina complexa o íon Fe^{2+} , dando origem a um complexo de cor laranja avermelhado com elevada absorvidade molar. A intensidade da cor do complexo ferro – o-fenatrolina é independente do pH no intervalo de 2-9, porem o método SBET simula as condições gástricas sob um pH de 1,5. A alteração do pH proposto pelo método não se faria possível uma vez que nos estudos anteriormente realizados (SANTOS *et al.*, 2009), constatou-se que a variável pH atua de forma bastante significativa nos valores finais de bioacessibilidade para o Fe.

Dada a larga utilização de feijão-de-corda na culinária nordestina, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar constituintes químicos do feijão-de-corda in natura. Os objetivos específicos foram: (a) avaliar o melhor sistema de solventes para extração de polifenóis e flavonoides dos grãos de feijão-de-corda in natura, (b) determinar os teores totais destes compostos presentes nos grãos; (c) realizar a especiação do Ferro quanto ao Estado de Oxidação no feijão-de-corda; (d) comparar os valores de bioacessibilidade, segundo o método SBET, em grãos de feijão-de-corda; (e) substituir o procedimento de extração pelo procedimento de centrifugação do Método SBET.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Determinação de compostos fenólicos

2.1.1. Extração dos compostos fenólicos

O feijão-de-corda verde, lavado, foi triturado e a massa resultante foi colocada em maceração por 20 minutos no solvente de extração, utilizando-se a proporção de 200 mL de solvente para 250 g de feijão triturado. Após os 20 minutos a mistura foi filtrada. Repetiu-se mais duas vezes a maceração e a filtração, reunindo-se os filtrados. Foram testados dois sistemas de solventes para extração: etanol:água 4:1 v:v, e metanol:água 4:1 v:v.

Os extratos tiveram o solvente removido, até massa constante, em evaporador rotatório a pressão reduzida com aquecimento em banho-maria até no máximo 60°C.

A avaliação do melhor sistema de solventes para extração foi feita gravimetricamente e também com base no teor de compostos fenólicos totais.

2.1.2 Determinação do teor total de compostos fenólicos

A concentração dos compostos polifenólicos totais foi determinada utilizando-se 1mL do reagente de Folin-Ciocalteu, 8mL de água e 1 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio, acrescentadas a 0,5 mL do extrato bruto dos feijões. Este sistema foi analisado em espectrofotômetro UV-Vis com absorbâncias determinadas a 760 nm. Os testes foram realizados em triplicata e para o cálculo do doseamento de compostos fenólicos utilizou-se a curva analítica tendo o ácido gálico como padrão [$Y = 0,064x + 0,3786$ ($r = 0,9917$)]. O ácido gálico nas concentrações $2,42 \times 10^{-4}$ g/mL, $1,94 \times 10^{-4}$ g/mL, $1,45 \times 10^{-4}$ g/mL, $0,97 \times 10^{-4}$ g/mL; $0,48 \times 10^{-4}$ g/mL foi usado como padrão externo. Os teores de compostos fenólicos foram determinados em miligrama de ácido gálico por grama de grão verde (CHAILLOU *et al.*, 2009).

2.1.3. Determinação do teor total de flavonóides

A concentração de flavonóides foi determinada utilizando o método colorimétrico com cloreto férrico (FeCl_3). O sistema foi obtido adicionando-se 3 mL de extrato bruto dos feijões a 1 mL de cloreto férrico.

Após 15 minutos, o sistema foi analisado, utilizando-se o espectrofotômetro UV-Vis, com absorbâncias lidas em 425 nm. Os testes foram realizados em triplicata e para o cálculo do doseamento de flavonóides utilizou-se a curva padrão de quercetina [$Y = 0,4733x - 0,7452$ ($r = 0,9969$)]. A quercetina nas concentrações $2,42 \times 10^{-4}$ g/mL, $1,94 \times 10^{-4}$ g/mL, $1,45 \times 10^{-4}$ g/mL, $0,97 \times 10^{-4}$ g/mL; $0,48 \times 10^{-4}$ g/mL; $0,24 \times 10^{-4}$ g/mL foi usada como padrão externo. Os teores de flavonóides foram determinados em miligrama de quercetina por grama de grão verde (CHAILLOU et al., 2009; DOWD, 1959).

2.2. Especificação do ferro e bioacessibilidade

No preparo das amostras de feijão para determinação do teor total e da bioacessibilidade usou-se moinho criogênico MA 775 (Marconi, Brasil), contendo frasco de moagem em policarbonato com duas tampas de aço inoxidável, imersos em nitrogênio líquido e barra magnética em aço.

2.2.1. Verificação do comportamento do complexo Ferro – o-fenantrolina em pH 1,5

Para verificar o comportamento do complexo em estudo, foi construída uma curva analítica nas concentrações de 0,00; 0,05; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30 mg/L sob as mesmas condições do método SBET (glicina 0,40 mol/L, pH 1,5 corrigido com HCl) com a adição da o-fenantrolina sem redutor. O comprimento de onda de 504,0 nm foi escolhido por apresentar maior intensidade de absorção do complexo formado.

2.2.2. Verificação da interconversão entre os íons Fe^{2+} e Fe^{3+}

Outro ponto a ser discutido no método era a possibilidade da interconversão entre os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} ou seja, a sua seletividade a ponto de garantir a especificação efetiva do ferro II em meio a solução contendo o ion ferro III.

Para verificar tal seletividade, realizou-se um teste preliminar empregando o método baseado na formação do complexo Fe–ortofenantrolina sem a utilização do agente redutor. Prepararam-se soluções padrão dos íons Fe II e Fe III, as quais foram analisadas separadamente e em seguida em uma solução combinada.

Inicialmente, foi obtido o espectro de absorção do complexo Fe-ortofenantrolina empregando espectrofotômetro de absorção molecular no UV/Vis (CARE, Varian). Um valor máximo de absorbância foi obtido no comprimento de onda 504,0 nm.

As soluções estoque de Fe II e III foram preparadas a partir de sulfato ferroso amoniacal, $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$ e sulfato férrico amoniacal, $(NH_4)Fe(SO_4)_2$, respectivamente. As amostras das soluções padrão foram preparadas em triplicata, sendo uma delas a 0,300 mg/L de Fe (II) e outra, contendo concentrações de Fe (II) e Fe (III) na concentração de 0,200 mg/L.

2.2.3. Bioacessibilidade

Para a determinação da bioacessibilidade do ferro, foi aplicado o método SBET. O SBET é um método utilizado para simular a mobilização das substâncias nas condições gástricas do estômago, desconsiderando o compartimento intestinal, aplicado para a determinação da solubilidade/biodisponibilidade de chumbo em amostras de solos contaminados, sendo adaptado do método descrito inicialmente por Ruby e colaboradores em 1993 (OOMEN et al., 2002). A simulação da digestão é feita empregando-se 100 mL de fluido extrator, o qual contém glicina a uma concentração de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ em um pH 1,5 ajustado com ácido clorídrico concentrado, a 1g da amostra. A mistura é então submetida a uma agitação tipo *end-over-end* a 30 rpm, por um período de 1h, a uma temperatura constante de 37 °C. Em seguida é realizada uma filtração através de um filtro de disco de acetato celulose de porosidade 0,45 µm.

A razão entre o teor total do analito presente na amostra e no filtrado corresponde à bioacessibilidade. Essa relação é então multiplicada por um fator de 100 e o resultado final é expresso em percentagem de bioacessibilidade, como ilustrado na Equação 1.

$$\%B = \frac{Y}{Z} \times 100 \quad [\text{Eq. 01}]$$

onde Y é o teor do elemento na fração bioacessível e Z o teor total do elemento.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação de compostos fenólicos

O procedimento de preparação dos extratos brutos do feijão triturado gerou, após remoção do solvente de extração, os seguintes rendimentos mássicos:

- 2,2% de extrato seco para extração com etanol:água 4:1 v:v
- 1,8% de extrato seco para extração com metanol:água 4:1 v:v

Observa-se que o rendimento mássico da extração com metanol:água foi superior ao da extração com etanol:água. Estes resultados indicam apenas que o sistema de solventes metanol:água extraiu maior quantidade de massa dos grãos, porém só com estes dados não é possível afirmar qual o melhor solvente para extração de polifenóis. Para tanto é necessário a determinação do teor total destes compostos em cada extrato.

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos para a construção da curva analítica para determinação do teor total de compostos fenólicos, tendo o ácido gálico como padrão externo.

Tabela 1. Dados obtidos para a construção da curva analítica para determinação do teor total de compostos fenólicos

Concentração do ácido gálico (X10 ⁻⁴ g/mL)	Absorbância a 760 nm
2,42	0,539
1,94	0,499
1,45	0,466
0,97	0,442
0,48	0,412

A Figura 1 apresenta a construção da curva analítica para determinação do teor total de compostos fenólicos, tendo o ácido gálico como padrão externo.

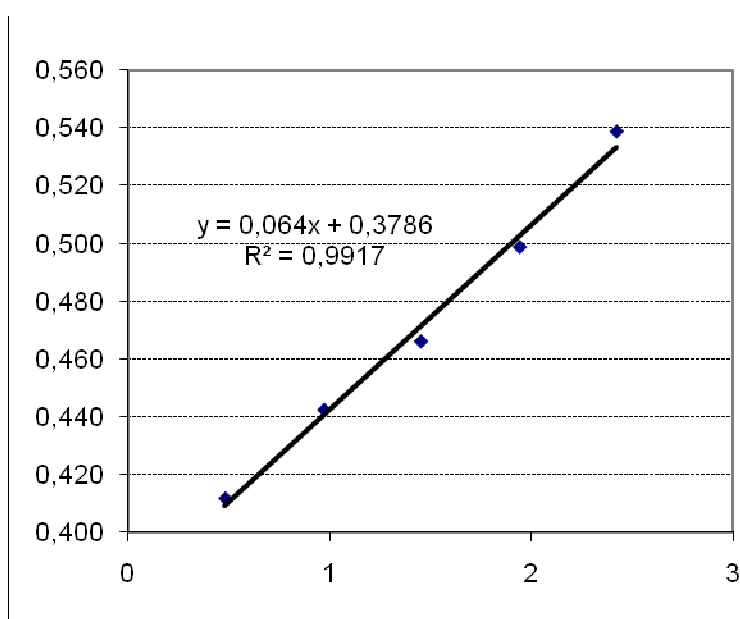


Figura 1. Curva analítica para determinação do teor total de compostos fenólicos

As absorbâncias medidas para as amostras preparadas a partir do extrato obtido com metanol:água geram um valor médio de 0,476, que resulta na concentração de $1,52 \times 10^{-4}$ g/mL de ácido gálico.

As absorbâncias medidas para as amostras preparadas a partir do extrato obtido com etanol:água geram um valor médio de 0,447, que resulta na concentração de $1,07 \times 10^{-4}$ g/mL de ácido gálico.

Com base nos dados acima, constata-se que embora a extração com etanol:água tenha gerado um rendimento mássico maior (2,2% de extrato seco) do que o rendimento da extração com metanol:água (1,8% de extrato seco), o sistema de solvente metanol:água mostrou-se mais eficiente na extração de compostos polifenólicos.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos para a construção da curva analítica para determinação do teor total de flavonoides, tendo a quercetina como padrão externo.

Tabela 2. Dados obtidos para a construção da curva analítica para determinação do teor total de flavonoides

Concentração da quercetina ($\times 10^{-4}$ g/mL)	Absorbância a 425 nm
2,42	1,918
1,94	1,654
1,45	1,404
0,97	1,184
0,48	0,989
0,24	0,872

A Figura 2 apresenta a construção da curva analítica para determinação do teor total de flavonoides, tendo a quercetina como padrão externo.

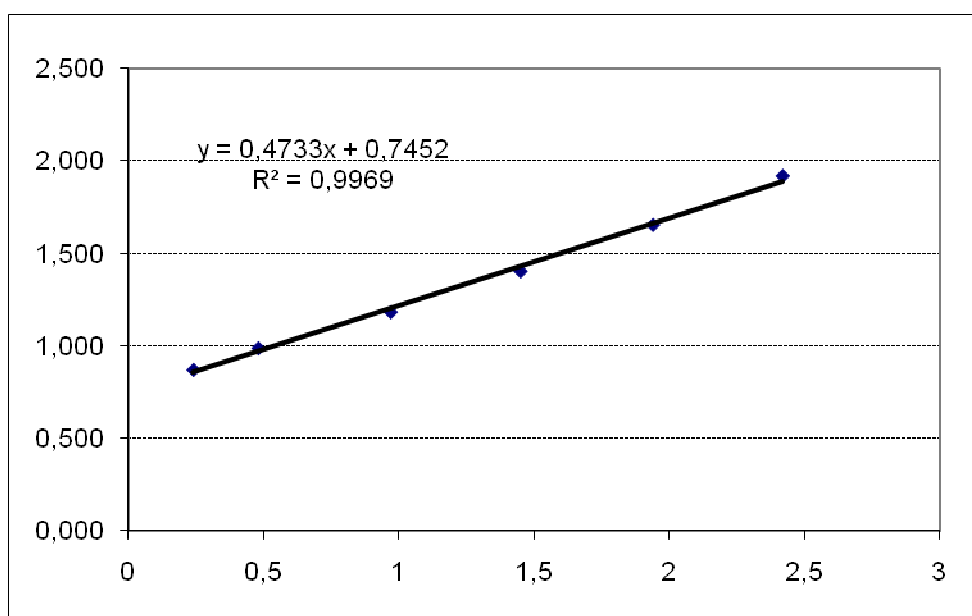


Figura 2. Curva analítica para determinação do teor total de compostos fenólicos

As absorbâncias medidas para as amostras preparadas a partir do extrato obtido com metanol:água geram um valor médio de 0,866, que resulta na concentração de $0,25 \times 10^{-4}$ g/mL de quercetina.

As absorbâncias medidas para as amostras preparadas a partir do extrato obtido com etanol:água geram um valor médio de 0,892, que resulta na concentração de $0,31 \times 10^{-4}$ g/mL de quercetina.

Com base nos dados acima, constata-se que no extrato obtido com etanol:água foi determinada uma menor proporção de compostos fenólicos porém uma maior proporção de flavonóides que no extrato obtido com metanol:água. Observa-se ainda que a relação entre o teor de flavonóides (medido em g/mL de quercetina) é cerca de 10% do teor de compostos fenólicos (medido em g/mL de ácido gálico), indicando que possivelmente a maior proporção de compostos fenólicos sejam taninos e ácidos fílicos ou seus derivados (fitatos), conforme relatado na literatura (ASSIS, NAHAS, 1999).

3.2. Especificação do Ferro e bioacessibilidade

Com base na curva analítica (Figura 3) construída sob as condições do método SBET, verificou-se uma boa sensibilidade do método além de uma boa linearidade ($R^2 = 0.99605$) na faixa em estudo. O que indica a viabilidade da quantificação do ferro II na fração extratora.

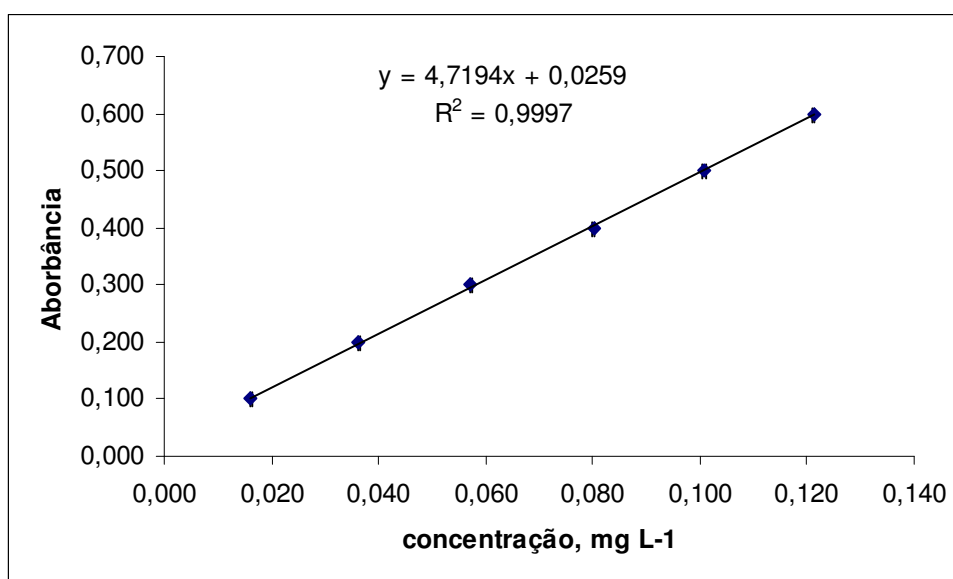


Figura 3. Curva analítica nas condições experimentais do método SBET

Os resultados encontrados demonstraram que as soluções que continham exclusivamente o íon Fe III não apresentaram sinais analíticos intensos, uma vez que somente os íons Fe II complexam com o-fenantrolina. Além do mais, os sinais pequenos poderiam advir de impurezas presentes do reagente empregado. Para as soluções que continham apenas o Fe II, os resultados mostraram-se exatos e precisos. Já para a solução combinada, os resultados não indicaram nenhum aumento de sinais provenientes de uma possível interconversão dos íons Fe III em Fe II, denotando assim uma efetiva especificação do ferro.

Após a extração empregando o método SBET, o Fe II foi quantificado no extrato segundo o método proposto, i.e. método adaptado do complexo FeII-ortofenantrolina, sem a adição de hidroxilamina (agente redutor). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teores, mg/kg, de ferro nas frações obtidas.

	Ferro II na fração extraída	Ferro Total	Bioacessibilidade do Fe II
Média	14,45	53,47	27,03
Sd	0,82	1,68	1,54
RSD	5,68	3,14	5,68

O percentual de bioacessibilidade de ferro II obtido encontra-se abaixo dos valores de bioacessibilidade de ferro total (37 %) determinados em estudos anteriores (Santos et al., 2009). Estes valores são concordantes com os reportados na literatura para ferro em leguminosas de grão. Desta forma pode-se concluir que há uma coerência com os resultados obtidos empregando o método proposto para especiação de ferro.

Considerando que o método SBET fornece resultados superestimados devido a simulação da fase gástrica somente, pode-se inferir que os resultados obtidos correspondem a fração máxima de ferro II passível a absorção no metabolismo humano.

4. CONCLUSÕES

Constatou-se que o sistema de solventes etanol:água 4:1 gerou maior rendimento mássico, porém com menor teor de compostos fenólicos no material extraído. Assim, recomenda-se o uso do sistema de solventes metanol:água 4:1 para determinação de compostos fenólicos.

Constatou-se também que apenas cerca de 10% dos compostos fenólicos presentes nos extratos são flavonóides, permitindo-se inferir que possivelmente a maior parte de compostos fenólicos compõe-se de fitatos ou taninos, que são considerados agentes anti-nutricionais. Assim sendo, embora o teor de compostos fenólicos seja significativo (cerca de 2%), apenas uma pequena parte destes são flavonóides, do que se deriva a inferência de que a grande maioria (fitatos ou taninos) são tidos como fatores antinutricionais. Vale ressaltar que descobertas recentes que evidenciam o potencial de fitatos e taninos em exercer funções benéficas ao organismo humano, já que se observou a habilidade do ácido fítico em atuar como anticarcinogênico, antioxidante e prestar contribuição nutricional no tratamento de diabetes, através da ação inibidora de α -amilases. Além disto, embora os taninos influenciem negativamente a digestibilidade de proteínas, eles são antioxidantes e inibidores de determinadas enzimas (ASSIS, NAHAS, 1999).

Quanto ao estudo da bioacessibilidade de ferro II, observou-se que o resultado obtido encontra-se abaixo dos valores de bioacessibilidade de ferro total (37 %) determinados em estudos anteriores e que os valores são concordantes com os reportados na literatura para ferro em leguminosas de grão. Sabendo que o método SBET fornece resultados superestimados devido a simulação da fase gástrica somente, pode-se inferir que os resultados obtidos correspondem a fração máxima de ferro II passível a absorção no metabolismo humano. Estudos complementares estão sendo realizados com o objetivo de conhecer a relação do teor de ferro II e ferro III nas amostras dessas leguminosas.

5. REFERÊNCIAS

- ASSIS, M.A.A.; NAHAS, M.V. ASPECTOS NUTRICIONAIS DE FITATOS E TANINOS. *Rev. Nutr.*, Campinas, 12(1): 5-19, 1999
- CHAILLOU, L. L.; NAZARENO, M.A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology* v.42 , p.1422–1427, 2009.
- DOWD LE (1959) Spectrophotometric determination of quercetin, *Anal.Chem.* 31(7) 1184-1187
- GONÇALVES, A.E.S.S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e Vitamina C. São Paulo.2008. Tese(Mestrado em ciência dos alimentos) – Universidade de São Paulo.
- INTAWONGSE, M; DEAN, R. J. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends in Analytical Chemistry* v. 25, p. 876-886, 2006.
- OOMEN, A. G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJDER, E.; CORNELIS, S. C.; SCHOETERS G.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T.; WRAGG, J.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A.; VAN WIJNEN J. H.; Comparison of five in-vitro digestion model to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 2002, v. 36, p. 3326.
- SANTOS, W. P. C.; GOMES NETO, R.J.; MERCANDELLI, S.S. Avaliação multivariada do método sbet para estimativa da bioacessibilidade de micronutrientes em leguminosas. *Anais do CONNEPI*, 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da FAPESB, e da Universidade Federal da Bahia pela utilização de equipamentos.