



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ANA PAULA RIBEIRO GASPAR

**EFEITO DOS FEIJÕES-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.)
BIOFORTIFICADOS NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E NO
METABOLISMO GLICÍDICO E LIPÍDICO DE RATOS ANÊMICOS ALIMENTADOS
COM DIETA RICA EM GORDURA E AÇÚCAR**

ALEGRE – ES
AGOSTO – 2024

ANA PAULA RIBEIRO GASPAR

**EFEITO DOS FEIJÕES-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.)
BIOFORTIFICADOS NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E NO
METABOLISMO GLICÍDICO E LIPÍDICO DE RATOS ANÊMICOS ALIMENTADOS
COM DIETA RICA EM GORDURA E AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa
Coorientadora: Dra. Cíntia Tomaz Sant' Ana
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Mariana Grancieri

ALEGRE – ES
AGOSTO – 2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

G249e Gaspar, Ana Paula Ribeiro, 1991-
Efeito dos feijões-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)
biofortificados na biodisponibilidade de ferro e no metabolismo
glicídico e lipídico de ratos anêmicos alimentados com dieta rica
em gordura e açúcar / Ana Paula Ribeiro Gaspar. - 2024.
111 f. : il.

Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa.
Coorientadores: Mariana Grancieri, Cíntia Tomaz Sant'Ana.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Feijão. 2. Ferro - Metabolismo. 3. Anemia ferropriva. 4.
Compostos bioativos. I. Costa, Neuza Maria Brunoro. II.
Grancieri, Mariana. III. Sant'Ana, Cíntia Tomaz. IV.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 664

ANA PAULA RIBEIRO GASPAR

**“EFEITO DOS FEIJÕES-CAUPI (VIGNA UNGUICULATA (L.)
WALP.) BIOFORTIFICADOS NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO
E NO METABOLISMO GLICÍDICO E LIPÍDICO DE RATOS
ANÊMICOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM GORDURA E
AÇÚCAR”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 27 de agosto de 2024.

Profa. Dr^a. Neuza Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientadora

Pós Doc Dr^a. Mariana Grancieri
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Coorientadora - Interna

Pós Doc Dr^a. Cíntia Tomaz Sant'Ana
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Coorientadora - Interna

Profa. Dr^a. Hércia Stampini Duarte Martino
Universidade Federal de Viçosa - UFV
Membra Externa

Profa. Dr^a. Maria das Graças Vaz Tostes
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Membra Externa





Folha de Rosto Defesa Dissertação - Ana Paula Ribeiro Gaspar

Data e Hora de Criação: 28/08/2024 às 15:36:30

Documentos que originaram esse envelope:

- Folha de Rosto Defesa Dissertação - Ana Paula Ribeiro Gaspar.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: cdbf8d8e11c3a71db0dd1e1b0e5c9d8d5cac7a30a83b2ba197d8b5c6889a

[SHA512]: b6a2a0a1ebc6838b2eddb5b882a281ba48a904ec255cae79b29e81116415b2c47a530b1f219725ba44442787cdbc29b2cddcf20a09497d34a1261950611110a

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Neuza Maria Brunoro Costa (neuza.coستا@ufes.br)

Data/Hora: 28/08/2024 - 15:37:38, IP: 200.137.72.202, Geolocalização: [-20.759518, -41.531259]

[SHA256]: 5a549f00c9c074a9a0709315541567482d33a683c6db807a971726dc6b817b



ASSINADO - Mariana Grancieri (marianagrancieri@gmail.com)

Data/Hora: 28/08/2024 - 15:44:02, IP: 179.185.15.201, Geolocalização: [-20.851605, -41.114507]

[SHA256]: 72d99af5523a3ac26c8f35778cb87e1aaed49ac9dca768dca5f9b7911131



ASSINADO - Cintia Tomaz Sant'Ana (cintia_santana28@hotmail.com)

Data/Hora: 28/08/2024 - 15:44:59, IP: 200.137.72.202, Geolocalização: [-20.762419, -41.535488]

[SHA256]: 67c048ac1f47b4ed1113a3c8e6a76528033b35c3331211ac19282cb83d7b5a46



ASSINADO - Hercia Stampini Duarte Martino (hercia72@gmail.com)

Data/Hora: 28/08/2024 - 16:06:14, IP: 177.129.55.248

[SHA256]: 6d1eac9c48357b880125e1b47739bd1ab4cac054a051dcf274e598411337ab2



ASSINADO - Maria das Graças Vaz Tostes (mgvaztostes@gmail.com)

Data/Hora: 28/08/2024 - 16:06:31, IP: 200.137.72.202

[SHA256]: 4c85231263fb69787c84e709629c2a5d7d0ac9d42845ca3cc5432e7433

Histórico de eventos registrados neste envelope

28/08/2024 16:06:31 - Envelope finalizado por mgvaztostes@gmail.com, IP 200.137.72.202

28/08/2024 16:06:31 - Assinatura realizada por mgvaztostes@gmail.com, IP 200.137.72.202

28/08/2024 16:06:26 - Envelope visualizado por mgvaztostes@gmail.com, IP 200.137.72.202

28/08/2024 16:06:14 - Assinatura realizada por hercia72@gmail.com, IP 177.129.55.248

28/08/2024 15:44:59 - Assinatura realizada por cintia_santana28@hotmail.com, IP 200.137.72.202

28/08/2024 15:44:50 - Envelope visualizado por cintia_santana28@hotmail.com, IP 200.137.72.202

28/08/2024 15:44:02 - Assinatura realizada por marianagrancieri@gmail.com, IP 179.185.15.201

28/08/2024 15:37:38 - Assinatura realizada por neuza.coستا@ufes.br, IP 200.137.72.202

28/08/2024 15:37:33 - Envelope visualizado por neuza.coستا@ufes.br, IP 200.137.72.202

28/08/2024 15:36:52 - Envelope registrado na Blockchain por neuza.coستا@ufes.br, IP 200.137.72.202

28/08/2024 15:36:51 - Envelope encaminhado para assinaturas por neuza.coستا@ufes.br, IP 200.137.72.202

28/08/2024 15:36:31 - Envelope criado por neuza.coستا@ufes.br, IP 200.137.72.202



Documento em conformidade com o padrão de assinatura digital ICP-Brasil e
validado de acordo com o Instituto Nacional de Tecnologia da Informação

Os registros de assinatura presentes nesse documento pertencem única e exclusivamente a esse envelope.

Documento final gerado e certificado por **Universidade Federal do Espírito Santo**



Dedico essa dissertação primeiramente à Deus, dono de tudo e de todos. Aos meus pais e marido. Que todo tempo que fiquei longe de vocês nunca tenha sido em vão.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida, por me proporcionar saúde, paciência e sabedoria. Graças ao Senhor até mesmo os obstáculos se tornam lições valiosas.

Aos meus pais, Gisélia Ribeiro Gaspar e José Paulo Gaspar, que são pilares da minha formação e que sempre acreditaram em mim. Vocês abdicaram de muitas coisas em prol das filhas, e meu sucesso é reflexo do amor e união de vocês. Minha gratidão à Deus por terem vocês como pais será eterna.

Ao meu marido, amigo e companheiro de todas as horas, Silvio Ventura, por todo o amor, apoio e incentivo, por chorar e sorrir sempre comigo nos momentos mais felizes e nos mais difíceis, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos. Você faz parte dessa conquista!

À minha eterna companheira de quatro patas, Ti, por ser minha única companhia muitas vezes e pela lealdade incondicional.

À minha irmã Simone Ribeiro Gaspar e aos meus sobrinhos Nicollas e Anna Liz Gaspar por me proporcionarem alegria e amor incondicional.

À querida orientadora, Prof^a. Dra Neuza Maria Brunoro Costa, que honra te conhecer! Tenho imensa admiração pelo seu comprometimento com o ensino e pela dedicação com que se envolve em tudo que faz. Agradeço por todos os conhecimentos e ensinamentos compartilhados, pelo privilégio de ter sido sua orientada e pelo exemplo extraordinário de pessoa e profissional.

Às coorientadoras Dra. Cíntia Tomaz Sant'ana e Prof^a. Dra. Mariana Grancieri, agradeço profundamente pelo tempo dedicado, pelos *feedbacks* construtivos e *insights* valiosos. O comprometimento e a expertise de vocês foram inspiradores e fizeram toda a diferença na qualidade e no sucesso do projeto. É uma honra ter tido a oportunidade de aprender com profissionais tão competentes e dedicadas.

Ao técnico Eduardo Lorencetti Fornazier do Laboratório de Nutrição Experimental, pelo comprometimento, por fazer além do seu trabalho, sempre ajudar quando precisávamos e pelas inúmeras histórias que proporcionou muitas risadas.

Aos demais membros e colegas da equipe de pesquisa: Ana Paula, Marisa, Leone, Maria Eduarda, Mateus e Leon. Cada um de vocês contribuiu de maneira única e significativa para o sucesso do projeto, e sou muito grata por isso.

Ao Antônio Raimundo, secretário aposentado da Pós-Graduação, por todo o auxílio, apoio, incentivo, orientação e suporte desde o processo de seleção.

Aos parceiros da Universidade Federal de Viçosa, por permitirem abrir as portas dos laboratórios na para realização de algumas análises.

Ao professor Diego Lang Burak, do Departamento de Agronomia (UFES), pela disponibilidade de tempo e ajuda nas análises do teor de ferro.

Ao professor Dirlei Molinari Donatele e aluna da pós-graduanda Natânia, pela disponibilidade de tempo e ajuda em relação aos animais do experimento.

À professora Jankerle Neves Boeloni e ao técnico de laboratório Henrique Jordem Venial, pela disponibilidade de tempo e apoio inestimável durante as incansáveis análises histológicas, suas orientações me ajudaram a superar os obstáculos e a aprimorar meu trabalho.

Aos demais técnicos e professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFES, por todos os ensinamentos e apoio.

A cada membro da banca da dissertação, por cada contribuição significativa e essencial ao trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela parceria e pelo apoio.

Ademais, meu agradecimento a todos aqueles que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização e concretização dessa pesquisa, e tornaram possível a realização de um sonho!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de absorção do Fe.	6
Figura 2. Mecanismo hepcidina.....	7
Figura 3. Quadro obesogênico e suas complicações ao metabolismo de ferro.	11
Figura 4. Mecanismo esteatose hepática.	14
Figura 5. Vias de atuação dos ácidos graxos de cadeia curta.	24
Figura 6. Matéria-prima.	28
Figura 7. Dietas experimentais da fase de repleção.	34
Figura 8. Delineamento experimental.....	36
Figura 9. Murinometria.	39
Figura 10. Fezes dos grupos de tratamento.....	41
Figura 11. Atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais da farinha dos feijões-caupi.....	51
Figura 12. Área incremental sob a curva de glicose sanguínea (iAUC).	69
Figura 13. Fotomicroscopia de fígados de ratos Wistar não tratado e tratados após 8 semanas com dieta rica em gordura e açúcar.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos funcionais do feijão.....	20
Tabela 2. Composição das dietas experimentais.	38
Tabela 3. Sistema de classificação para esteatose.....	46
Tabela 4. Composição centesimal, VET, amido resistente, fatores complexantes e ferro dos feijões-caupi.	48
Tabela 5. Análise do consumo alimentar e ganho de peso na fase da depleção.....	54
Tabela 6. Fase 1: análise do consumo alimentar e ganho de peso na fase da repleção (14 dias).....	55
Tabela 7. Fase 2: análise do consumo alimentar e ganho de peso na fase da repleção (35 dias).....	56
Tabela 8. Indicadores murinométricos e peso dos tecidos adiposos.	58
Tabela 9. Ingestão e excreção lipídica diária dos ratos Wistar.....	59
Tabela 10. Produção de acetato, butirato, propionato e avaliação do pH cecal.....	61
Tabela 11. Concentração e ganho de hemoglobina (g/dL).	62
Tabela 12. % HRE (<i>Hemoglobin Regeneration Efficiency</i>) e RBV (Valor Biológico Relativo) fase da repleção.....	63
Tabela 13. Ferro sérico e proteínas do metabolismo férrico.	65
Tabela 14. Indicadores bioquímicos do sangue (mg/dL).....	67
Tabela 15. Efeitos dos tratamentos sobre resposta insulínica.	71
Tabela 16. Peso do fígado, índice hepatossomático, peso corporal final e perfil lipídico hepático.....	73
Tabela 17. Classificação da esteatose (n =6).	75

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. Objetivos	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Metabolismo do ferro.....	5
3.2. Funções do ferro no organismo.....	8
3.2.1. Deficiência de ferro	9
3.3. Alterações metabólicas relacionadas ao metabolismo do ferro no contexto de uma dieta ocidental	10
3.4. Biofortificação	16
3.5. Feijão.....	17
3.5.1. Propriedades funcionais do feijão	19
3.5.2. Fibras alimentares e fatores complexantes de minerais.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Matéria-prima	27
4.2. Processamento da matéria-prima	27
4.3. Análises físico-químicas	28
4.3.2. Composição centesimal e amido resistente	28
4.3.3. Determinação do teor de ferro	29
4.3.4. Determinação fitato e tanino.....	29
4.3.4.1. Razão molar fitato:ferro..	30
4.3.5. Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante	30
4.3.5.1. Preparo do extrato	30
4.3.5.2. Compostos fenólicos totais	30
4.3.5.3. Capacidade antioxidante	31
4.3.5.3.1.Método ABTS (Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))	31

4.3.5.3.2.Método DPPH (Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazina)	31
4.4. Ensaio biológico	32
4.4.5. Comissão de ética	32
4.4.6. Delineamento experimental	32
4.4.6.1. Fase da depleção	33
4.4.6.2. Fase da repleção	34
4.4.7. Dietas experimentais	37
4.4.8. Ganho de peso e de consumo alimentar	38
4.4.9. Dados murinométricos	39
4.5. Eutanásia	40
4.6. Análises conteúdo fecal e cecal	40
4.6.1. Secagem das fezes	40
4.6.1.1. Extração fecal de lipídios	41
4.6.2. pH do conteúdo cecal	42
4.6.3. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) do conteúdo cecal	42
4.7. Biomarcadores hematológicos	43
4.8. Análise dos reguladores do metabolismo ferro	44
4.9. Análise bioquímica e teste de tolerância a glicose (GTT)	44
4.9.1. Perfil lipídico e enzimas hepáticas	44
4.9.2. Perfil glicídico	45
4.9.2.1. Glicemia de jejum e análise insulínica	45
4.9.2.2. Teste de tolerância à glicose via intraperitoneal	45
4.11. Histologia hepática	46
4.12. Análise estatística	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Análises físico-químicas dos feijões-caupi	48
5.1.1. Capacidade antioxidante e fenólicos totais dos feijões-caupi	51
5.4. Análises do estudo <i>in vivo</i>	54
5.4.1. Efeitos das dietas sobre ganho de peso e consumo alimentar	54
5.4.1.1. Fase da depleção	54
5.4.1.2. Fase da repleção	55

5.4.2. Medidas murinométricas e tecidos adiposos	57
5.4.3. Análise conteúdo fecal e cecal	59
5.4.3.1. Efeitos dos feijões-caupi na excreção lipídica fecal.....	59
5.4.3.2. Implicações do feijão-caupi na produção de ácidos graxos de cadeia curta.....	60
5.4.4. Biodisponibilidade de ferro dos feijões-caupi	62
5.4.5. Biomarcadores do metabolismo do ferro	65
5.4.5. Efeitos dos feijões-caupi sobre os parâmetros bioquímicos	66
5.4.5.1. Efeitos dos tratamentos sob a reposta glicêmica pós-prandial.....	69
5.4.5.2. Efeitos dos feijões-caupi na resistência insulínica	71
5.4.7. Efeito dos feijões-caupi na saúde hepática.....	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....	95

RESUMO

GASPAR, Ana Paula Ribeiro. **Efeito dos feijões-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) biofortificados na biodisponibilidade de ferro e no metabolismo glicídico e lipídico de ratos anêmicos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar.** 2024. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Prof^ª. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa. Coorientadoras: Dra. Cíntia Tomaz Sant’Ana e Prof^ª. Dra. Mariana Grancieri.

A deficiência de nutrientes e micronutrientes é condição de elevada incidência mundialmente, seja pela ausência de uma dieta nutricionalmente equilibrada ou pelo consumo excessivo de alimentos ricos em gordura e açúcar e pobres em vitaminas e minerais. Isso pode ocasionar complicações metabólicas, sistêmicas, incluindo disfunções no metabolismo do ferro, glicídico e lipídico, predispondo o indivíduo a doenças crônicas não transmissíveis. Nesse contexto, o feijão biofortificado surge como uma estratégia para mitigar esses efeitos deletérios, atenuando quadros dislipidêmicos, marcadores do perfil glicídico e contribuindo no combate à anemia ferropriva. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos feijões-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) biofortificados na biodisponibilidade de ferro e no metabolismo glicídico e lipídico de ratos anêmicos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar. Foram utilizados dois cultivares biofortificados, BRS Aracê, BRS Tumucumaque e um cultivar convencional, BRS Pajeú. As análises físico-químicas determinaram a composição nutricional dos feijões. A biodisponibilidade de ferro foi avaliada pelo método depleção/repleção em modelo animal (n=60), consumindo dieta AIN-93G com 30% de teor lipídico, tendo como fonte principal a banha de porco e 30% de açúcar (dieta HFHS) ou dieta normal (NS). Na fase de depleção (21 dias), 12 animais receberam dieta NS, e 48 consumiram HFHS, ambas isentas de ferro. Na fase de repleção (35 dias), os animais receberam 12 ppm de ferro, proveniente de sulfato ferroso (SF) ou feijão-caupi. O grupo HFHS foi subdividido em quatro grupos (n=12): HS (HFHS + SF), HA (HFHS + Aracê), HT (HFHS + Tumucumaque) e HP (HFHS + Pajeú). A hemoglobina foi avaliada ao final da depleção e após 14 e 34 dias da repleção. Foram realizadas análises histológicas e bioquímicas relacionadas ao metabolismo lipídico, glicídico e férrico. Os resultados foram submetidos ao teste t não pareado, Análise da Variância seguida do teste de Tukey e correlação de Pearson (p<0,05). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (protocolo 013/2022). Como resultados, verificou-se que os taninos estavam ausentes nos três genótipos. O Aracê apresentou maior teor proteico e o Pajeú maior teor de fibra solúvel, amido resistente, fenólicos totais e razão Fitato:Ferro. As culturas biofortificadas demonstraram maior teor de ferro nos grãos. Todos demonstram biodisponibilidade de ferro semelhante à dieta padrão HS pelo RBV e HRE. O HA apresentou maior ganho de hemoglobina, menor pH e maior teor de butirato fecal do que o HP e apresentou ainda maior HDL-c, menor incremento da área abaixo da curva glicêmica e insulina do que o grupo HS. O HP obteve menor glicemia, triglicérides de jejum, índice TyG e razão TG/HDL-c. Todos os feijões apresentaram menor razão CT/HDL-c, mas menor excreção de triglicérides fecais comparadas ao HS. Todos os grupos demonstraram ausência de esteatose hepática. Os feijões-caupi, em geral, se mostraram boas fontes de ferro de alta biodisponibilidade e com propriedades promissoras para contrapor complicações do alto consumo de gordura e açúcar.

Palavra-chave: feijão, biofortificação, metabolismo de ferro e glicose, colesterol.

ABSTRACT

GASPAR, Ana Paula Ribeiro. **Effect of biofortified cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) on iron bioavailability and glucose and lipid metabolism of anemic rats fed a high-fat, high-sugar diet.** 2024. Dissertation (Master in Food Science and Technology) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof^a. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa. Co-advisors: Dra. Cíntia Tomaz Sant’Ana e Prof^a. Dra. Mariana Grancieri.

Nutrient and micronutrient deficiencies are a condition with high incidence worldwide, whether due to the lack of a nutritionally balanced diet or excessive consumption of foods rich in fat and sugar and poor in vitamins and minerals. This can cause metabolic and systemic complications, including dysfunctions in iron, glucose and lipid metabolism, predisposing the individual to chronic non-communicable diseases. In this context, biofortified beans emerge as a strategy to mitigate these deleterious effects, attenuating dyslipidemic conditions, markers of the glucose profile and contributing to the fight against iron deficiency anemia. Thus, this study aimed to evaluate the effect of biofortified cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) on iron bioavailability and glucose and lipid metabolism of anemic rats fed a diet rich in fat and sugar. Two biofortified cultivars, BRS Aracê, BRS Tumucumaque and a conventional cultivar, BRS Pajeú, were used. Physicochemical analyses determined the nutritional composition of the beans. Iron bioavailability was assessed by the depletion/repletion method in an animal model (n=60) consuming an AIN-93G diet with 30% lipid content, with lard as the main source and 30% sugar (HFHS diet) or a normal diet (NS). In the depletion phase (21 days), 12 animals received an NS diet and 48 consumed HFHS, both iron-free. In the repletion phase (35 days), the animals received 12 ppm of iron from ferrous sulfate (SF) or cowpea. The HFHS group was subdivided into four groups (n=12): HS (HFHS + SF), HA (HFHS + Aracê), HT (HFHS + Tumucumaque) and HP (HFHS + Pajeú). Hemoglobin was evaluated at the end of depletion and after 14 and 34 days of repletion. Histological and biochemical analyses related to lipid, glucose and ferric metabolism were performed. The results were submitted to the unpaired t-test, Analysis of Variance followed by Tukey's test and Pearson's correlation ($p < 0.05$). The project was approved by the Ethics Committee (protocol 013/2022). Tannins were absent in the three genotypes. Aracê had a higher protein content and Pajeú a higher content of soluble fiber, resistant starch, total phenolics and Phytate:Iron ratio. The biofortified crops demonstrated a higher iron content in the grains. All demonstrate iron bioavailability similar to the standard diet. HS by RBV and HRE. HA showed greater hemoglobin gain, lower pH and higher fecal butyrate content than HP and also showed higher HDL-c, lower increase in the area under the glycemic curve and insulin than the HS group. HP had lower glycemia, fasting triglycerides, TyG index and TG/HDL-c ratio. All beans showed lower CT/HDL-c ratio, but lower fecal triglyceride excretion compared to HS. All groups demonstrated the absence of hepatic steatosis. Cowpeas, in general, proved to be good sources of highly bioavailable iron and with promising properties to counteract complications of high fat and sugar consumption.

Keywords: beans, biofortification, iron and glucose metabolism, cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

A anemia por deficiência de ferro (Fe) é o distúrbio de deficiência nutricional mais prevalente mundialmente e a principal causa de anemia em crianças, especialmente nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (LEUNG et al., 2024; MILLER, 2019). Só no Brasil, cerca de 3 milhões de crianças menores de 5 anos são afetadas pela anemia ferropriva, e dentre as principais causas estão as deficiências nutricionais (BRASIL, 2023c). Essa condição anêmica reduz significativamente a qualidade de vida e o funcionamento diário dos indivíduos acometidos e é um indicador tanto de má nutrição como de má saúde (WHO, 2024).

Por outro lado, a essa deficiência de nutrientes, especialmente ferro, tem-se a dieta ocidental, rica em açúcar e gordura, mas apresentam menor teor de proteínas, fibra alimentar e costumam ser pobres em minerais e vitaminas (BRASIL, 2023a; CARVALHO; DUTRA; ARAÚJO, 2009; MARCHIONI; FISBERG, 2009; MARREIRO; CRUZ; MELO, 2020; SANTOS et al., 2023). Esta dieta é diretamente relacionada ao maior risco de alterações metabólicas, incluindo alterações no metabolismo glicídico e lipídico, além de indução de inflamação crônica no organismo (ALHAMAWI et al., 2024; CLEMENTE-SUÁREZ et al., 2023). Ramos et al. (2021), destaca que esse quadro inflamatório é fator de risco para desencadear dislipidemias, o que acaba contribuindo para patologias graves como hipertensão, aterosclerose e doenças cardiovasculares. Ademais, é fator de risco para o desenvolvimento de anormalidades hepáticas relacionados ao acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos que pode incluir esteatose hepática benigna até esteato-hepatite não alcoólica (JESUS et al., 2014). Esse aumento em nível epidêmico das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) que geralmente está associada à obesidade é uma preocupação crescente na população, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento e, na maioria das vezes, está relacionado às mudanças na dieta e no estilo de vida (BUDREVICIUTE et al., 2020; MARCHIONI; FISBERG, 2009).

Caracterizada pelo estado inflamatório, a obesidade pode acarretar estoques de Fe reduzidos devido a diversos mecanismos. Dentre eles, influência negativa sobre as proteínas essenciais do metabolismo do ferro, como a transferrina, DMT-1 e ferroportina, resultante da concentração desregulada de hepcidina (DIGNASS;

FARRAG; STEIN, 2018; STOFFEL et al., 2020). Com estoques limitados desse mineral, a eritropoiese é comprometida, o que pode causar alterações no metabolismo glicídico e lipídico, além de sinalizar uma homeostase metabólica interrompida (SOLIMAN et al., 2017). As citocinas inflamatórias, produzidas em maior quantidade em condições obesogênicas, influenciam diretamente o aumento da produção de hepcidina, prejudicando a sinalização da insulina, promovendo a oxidação inadequada de ácidos graxos e aumentando a lipogênese (DEWIDAR et al., 2020; VASSILIOU; FARIAS-PEREIRA, 2023). Além disso, o acúmulo de ferro nos adipócitos, vinculado à produção exacerbada de citocinas inflamatórias, impacta negativamente a sensibilização da insulina (FILLEBEEN et al., 2020). Outro aspecto relevante é que a hiperlipidemia, característica do quadro obesogênico, está associada ao aumento do estresse oxidativo e à redução das defesas antioxidantes endógenas (RAMOS et al., 2021).

Mediante todo o cenário, nota-se que a dieta tem papel crucial para a promoção e manutenção da saúde no momento presente e na vida tardia. Assim, estratégias têm sido desenvolvidas e adotadas, incluindo-se a biofortificação de culturas alimentares básicas com micronutrientes. Esta técnica vem sendo considerada uma alternativa promissora e com potencial para melhorar a saúde humana de forma sustentável, podendo contribuir na redução dos déficits de micronutrientes (ANTUNES et al., 2019; GOMES et al., 2022; MARCHIONI; FISBERG, 2009; SHEORAN et al., 2022).

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), é responsável por desenvolver os trabalhos de biofortificação, e, dentre os cultivares têm-se feijões que podem chegar a teores médios de Fe acima de 63,5 mg/kg (PEREIRA et al., 2020). *Per se*, o feijão já possui função valiosa, além de ser considerado alimento básico, ela fornece componentes primordiais, tais como fibras alimentares, proteínas, ferro e compostos bioativos como os fenólicos que auxiliam na promoção da saúde humana, além de possuir baixo teor de lipídios e sódio, o que atende assim às principais recomendações dietéticas (DIAS et al., 2020; NGUYEN et al., 2019; VIEIRA et al., 2023). Dentre os tipos de feijão, tem-se os feijões-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) que são alvos para biofortificação e são uma alternativa de baixo custo e com qualidade nutricional evidenciado em estudos científicos e, portanto, contribuir para uma melhor qualidade de vida da população (SILVA, 2022).

No entanto, a biodisponibilidade dos minerais alvos da biofortificação, tais como o ferro, pode ser reduzida devido a complexantes como taninos, fitatos e os compostos fenólicos naturalmente presente nos feijões (SANT'ANA, 2019).

Perante o exposto, o alvo desse estudo foi avaliar o efeito dos feijões-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) biofortificados na biodisponibilidade de ferro e no metabolismo glicídico e lipídico de ratos anêmicos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar. Dessa forma, nossa hipótese é que os feijões-caupi biofortificados tenham níveis de ferro nos grãos superior ao convencional e apresentem maior eficiência na absorção intestinal de ferro, além de melhor recuperação da anemia em comparação ao feijão convencional, e que os animais expostos às dietas com feijão-caupi biofortificado apresentem efeitos benéficos substanciais nos biomarcadores lipídicos e glicídicos, nos marcadores murinométricos, contrapondo as possíveis alterações metabólicas induzidos pela dieta rica em gordura e açúcar.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o efeito dos feijões-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) biofortificados na biodisponibilidade de ferro e no metabolismo glicídico e lipídico de ratos anêmicos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar.

2.2. Específicos

- I. Determinar a composição nutricional dos feijões-caupi convencional e biofortificados com ferro.
- II. Analisar os compostos complexantes de minerais e a capacidade antioxidante dos feijões-caupi.
- III. Avaliar o efeito dos feijões-caupi na excreção fecal de lipídios, colesterol e triglicérides fecal.
- IV. Avaliar o efeito dos feijões-caupi no pH e na produção de ácidos graxos de cadeia curta.
- V. Avaliar a biodisponibilidade e metabolismo do ferro dos feijões-caupi biofortificados e convencional em ratos Wistar anêmicos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar.
- VI. Estimar o efeito dos feijões-caupi convencional e biofortificados sobre os marcadores do perfil lipídico em ratos Wistar anêmicos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar.
- VII. Avaliar o efeito dos feijões-caupi sobre o perfil glicídico, tolerância glicêmica e resistência insulínica em ratos anêmicos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar.
- VIII. Avaliar o efeito dos feijões-caupi no nível de esteatose hepática nos ratos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar.

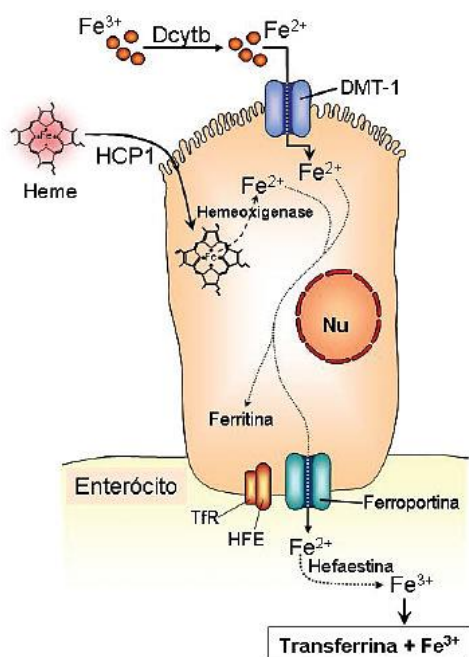
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Metabolismo do ferro

A absorção de ferro se dá de forma diferenciada entre o ferro heme e o ferro não heme. O ferro heme, presente na carne, é internalizado no enterócito e posteriormente liberado, pela hemeoxigenase, na forma de Fe^{2+} , que passa a seguir a mesma rota do ferro não heme proveniente dos demais alimentos (Figura 1). O ferro não heme deve entrar no duodeno e na parte superior do jejuno na forma solúvel. Contudo, o Fe^{3+} da dieta precisa ser reduzido a Fe^{2+} para ser internalizado pelos enterócitos, e a redução é feita a partir do citocromo B duodenal (DcytB) que é uma importante redutase férrica intestinal, e o transportador de metal bivalente (DMT-1) é a proteína que desempenha a função de internalizar o Fe^{2+} (GALLAGHER, 2013).

Para se obter uma atividade ótima do DMT-1 é necessário um baixo pH, pois é um canal dependente de prótons. Depois de importado para o enterócito, o Fe pode ser combinado ao *pool* intracelular para ser empregado em funções metabólicas locais ou ser armazenado como ferritina, que são encontradas predominantemente nos hepatócitos e nos macrófagos. A transferência do Fe recém-captado para a circulação portal é feita por meio da membrana basolateral, em que a passagem é mediada pela ferroportina (FPN). A FPN possui 571 aminoácidos e exporta Fe celular por um mecanismo de acesso em que alterna entre uma conformação aberta para dentro que se liga ao Fe intracelular e uma conformação aberta para fora que libera o Fe para o espaço extracelular. Entretanto, para deixar o meio intracelular, o Fe^{2+} precisa ser reoxidado a Fe^{3+} , para ligar-se a transferrina (Tf). No intestino, esse processo é feito pela hephaestina presente na membrana basolateral dos enterócitos. Uma vez combinado com a transferrina, o Fe^{3+} é transportado aos tecidos, e pode ser reconhecido e captado pelas células a partir da interação Tf - TfR1 (receptor de transferrina) (CARLI; COLLI, 2019; DIGNASS; FARRAG; STEIN, 2018; GROTTTO, 2008; NEMETH; GANZ, 2021). A Figura 1 resume o processo de metabolismo do ferro no organismo.

Figura 1. Processo de absorção do Fe.



Fonte: Grotto (2008).

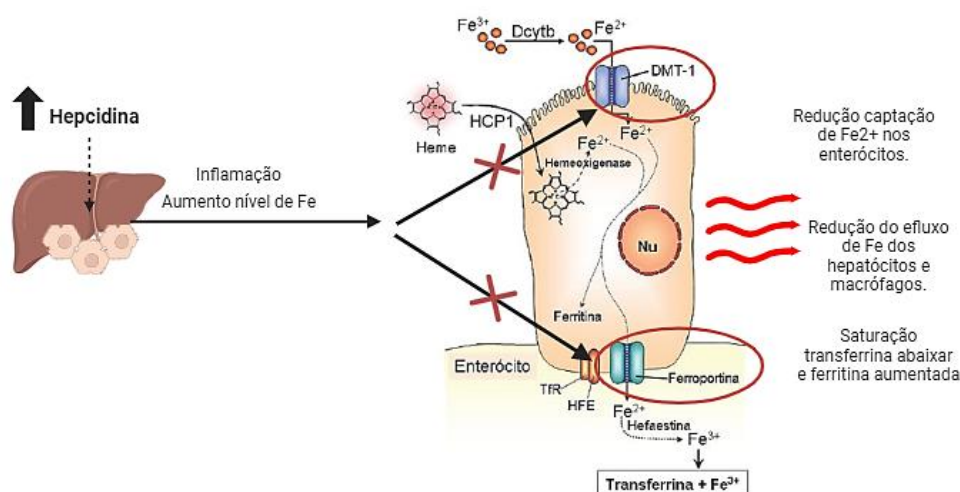
A quantidade de Fe absorvida é regulada pela necessidade do organismo, e de antemão, salienta-se que o teor de Fe nos alimentos não prediz sua biodisponibilidade, visto que a ingestão média diária na dieta é de 10 a 15 mg em humanos, e apenas 1 a 2 mg são absorvidos pelo sistema intestinal. Alguns fatores favorecem a absorção intestinal, como a acidez e a presença de agentes solubilizantes, como açúcares e aminoácidos, o enxofre também pode intensificar a entrada do mineral através da formação de quelatos com o Fe iônico (GALLAGHER, 2013; GROTTTO, 2008; PISKIN et al., 2022). O ácido ascórbico, o estimulador mais potente da absorção de Fe, reduz o ferro férrico em ferroso e forma um quelato que permanece solúvel em pH alcalino na parte inferior do intestino delgado (GALLAGHER, 2013).

No entanto, a homeostase sistêmica do Fe é regulada pela absorção em nível intestinal e mecanismos reguladores coordenados pelo hormônio hepático hepcidina (Figura 2), conhecida como hormônio regulador do Fe (CHARLEBOIS; PANTOPOULOS, 2023; DIGNASS; FARRAG; STEIN, 2018; LAL, 2020). Este hormônio pode inibir a exportação e ocluir o transportador DMT-1 (ASCHEMEYER et al., 2018).

A hepcidina é o principal peptídeo produzido pelos hepatócitos, contém 25 aminoácidos e é secretada no plasma sanguíneo. Em indivíduos saudáveis, a

produção de hepcidina aumenta em resposta ao aumento dos níveis de Fe sérico ligado à transferrina e das reservas. Nessa situação sua atuação pode ocasionar redução do efluxo de Fe das células ao ligar-se à FPN levando-a à sua internalização e degradação, e assim menos Fe ferroso (Fe^{2+}) fica disponível, restringindo assim a exportação de Fe dos enterócitos e dos estoques nos hepatócitos e macrófagos para restauração dos níveis normais (Figura 2) (CHARLEBOIS; PANTOPOULOS, 2023; DIGNASS; FARRAG; STEIN, 2018; HILTON et al., 2023; NEMETH; GANZ, 2021). Nas condições inflamatórias é sugerida também uma menor expressão da Dcytb e DMT-1 induzida pela hepcidina, que resulta na diminuição da captação de Fe^{2+} nos enterócitos (GROTTO, 2008).

Figura 2. Mecanismo hepcidina.



A hepcidina pode ligar-se a ferroportina e ocluir DMT-1, além de atuar negativamente na expressão gênica do Dcytb e DMT-1. Fonte: Adaptado de Grotto (2008).

A produção de hepcidina é regulada pelas concentrações plasmáticas de Fe; reservas hepáticas de Fe; inflamação sistêmica e atividade eritróide. Sua diminuição leva à sobrecarga de Fe nos tecidos, enquanto a superprodução ocasiona hipoferremia e a anemia da inflamação. Nota-se que a regulação FPN-hepcidina pode completar um ciclo homeostático: o Fe regula a secreção de hepcidina, que por sua vez controla a concentração de FPN na superfície celular (NEMETH et al., 2004; NEMETH; GANZ, 2021).

Ademais, o metabolismo equilibrado do Fe também é essencial para a produção adequada de insulina estimulada pela glicose. Estudos também mencionam

a conexão entre as vias metabólicas sistêmicas e celulares do Fe e da glicose. Tanto a sobrecarga quanto a deficiência de ferro podem levar a alterações metabólicas e resultar em doenças. A sobrecarga do mineral pode contribuir para a resistência insulínica através do estresse oxidativo excessivo, promovendo a apoptose das células β das ilhotas, o que afeta a secreção de insulina e aumenta o risco de resistência à insulina (FILLEBEEN et al., 2020; LIU et al., 2020).

Por outro lado, a deficiência do ferro está relacionada à aceleração de glicação da hemoglobina, mediado por mecanismos associados ao estresse oxidativo, como a redução da capacidade antioxidante e indução da peroxidação, visto que algumas enzimas antioxidantes dependem do ferro para manter sua atividade, o que pode acabar levando a valores falso-altos de HbA1c em indivíduos não diabéticos (GUO et al., 2019; SOLIMAN et al., 2017). Ademais, casos de anemia por deficiência de ferro está associada à menor atividade da arilesterase da paraoxonase-1 (PON-1) e à maior atividade dos triglicerídeos, além dos eritrócitos representam um importante componente antioxidante do sangue, mas estão reduzidos em quadros anêmicos (SOLIMAN et al., 2017).

3.2. Funções do ferro no organismo

O Fe é um micronutriente essencial para oxigenação, metabolismo energético celular e muitas reações enzimáticas (LAL, 2020). Ele desempenha um papel crucial em enzimas como a catalase, que age na redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), principalmente quando este é formado em grande quantidade, na cadeia de inibição de radicais livres (ALENCAR; HENRIQUES; COZZOLINO, 2020). É fundamental para a função dos glóbulos vermelhos, a atividade da mioglobina e o transporte de oxigênio e dióxido de carbono, além de ser um componente ativo dos citocromos, que estão envolvidos na respiração celular e na geração de ATP. Além de contribuir para a imunidade e o desempenho cognitivo (GALLAGHER, 2013).

Devido à sua importância na modulação da expressão gênica, a quantidade de Fe nas células deve ser rigorosamente regulada (HILTON et al., 2023; ONG; MORENO, 2009; PIRES et al., 2020). Contudo, apesar da ingestão adequada ser vital para a saúde, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o acesso a fontes de ferro heme, que é de origem animal, pode ser limitado devido ao valor. Além disso, algumas pessoas evitam esses alimentos por preferências pessoais ou a

sensibilidades. A partir desse contexto, estudos acerca do aumento da biodisponibilidade de Fe em alimentos alternativos as de origem animal é essencial (HUO et al., 2022; PISKIN et al., 2022; SWIATEK et al., 2023). E compreender os mecanismos do metabolismo do Fe pode levar ao desenvolvimento de intervenções terapêuticas para tanto a sobrecarga quanto a deficiência desse nutriente, visto que a biodisponibilidade limitada pode resultar em fadiga, problemas imunológicos, de crescimento, neurocognitivos e anemia ferropriva (CHARLEBOIS; PANTOPOULOS, 2023; HILTON et al., 2023; LAL, 2020).

3.2.1. Deficiência de ferro

O desenvolvimento da deficiência de Fe se dá de maneira lenta e progressiva, e a avaliação do estado nutricional ocorre em três estágios: a depleção das reservas de Fe; a deficiência de Fe eritropoético e a anemia por deficiência de Fe (COSTA; MARTINO, 2011). Dentre essas carências nutricionais latentes, a anemia por deficiência de ferro continua sendo um dos principais desafios, a falta de acesso a uma dieta variada e nutritiva impede que as pessoas obtenham os micronutrientes necessários (AVNEE et al., 2023; LIBERAL et al., 2020; WHO, 2024a). No Brasil, a anemia por deficiência de Fe é responsável por 90% dos casos anêmicos, atingindo principalmente crianças na primeira infância, mulheres em idade fértil e gestantes (BRASIL, 2023c; SIMAS et al., 2021).

A Organização Mundial da Saúde, OMS (2023a), define o quadro anêmico como uma condição na qual o número de glóbulos vermelhos ou a concentração de hemoglobina (Hb) é inferior ao normal, e além da carência de Fe, as deficiências de folato e vitaminas B12 e A também contribuem. A anemia por deficiência de Fe pode estar relacionada conjuntamente com o aumento das necessidades corporais, absorção reduzida, inflamação crônica como a obesidade, perda sanguínea crônica e doenças hereditárias dos glóbulos vermelhos (AL-NASEEM et al., 2021; WHO, 2024a).

Em relação aos sintomas e sinais vinculados a carência de Fe, logo destacam-se o cansaço, cefaleia, alterações na função cognitiva, distúrbios de sono, tontura, perda de cabelo, unhas fracas e quebradiças, alotriofagia, baixa tolerância ao exercício, menor rendimento laboral, taquicardia, sopro sistólico de ejeção, edema, dispneia e ortopneia 2. No feto pode ocasionar restrição no crescimento, baixo peso

ao nascer, prematuridade dentre outros (AL-NASEEM et al., 2021; BRASIL, 2023c). Em crianças pode haver o desenvolvimento de infecções frequentes, irritabilidade, apatia, anorexia, falta de atenção, dificuldades de aprendizagem e baixo rendimento cognitivo/intelectual; e no idoso, causar mais hospitalizações, declínio cognitivo, quedas e fraturas (BRASIL, 2023c).

Diante dos inúmeros desafios para combater problemas de saúde pública vinculados a deficiência de micronutrientes, a absorção adequada de Fe proveniente da dieta se torna crucial para prevenir estados de deficiência do mineral e patologias coexistentes, como a anemia; com isso encontrar alimentos com maior biodisponibilidade desse micronutriente para aumentar os seus níveis em humanos é essencial (CHARLEBOIS; PANTOPOULOS, 2023; LIBERAL et al., 2020).

3.3. Alterações metabólicas relacionadas ao metabolismo do ferro no contexto de uma dieta ocidental

A dieta ocidental é caracterizada dentre outros fatores, pela ingestão excessiva de alimentos refinados, com elevado teor de açúcar e gordura, sobretudo gordura saturada, além da baixa ingestão de frutas e vegetais. Isso pode ter um impacto substancial e negativo na saúde humana, afetando o sistema antioxidante, podendo aumentar o risco de estado inflamatório crônico, impactar na saúde da microbiota intestinal e capacidade mitocondrial. Além disso, há efeitos na saúde cardiovascular, saúde mental e câncer, distúrbios metabólicos, bem como aumento dos custos sanitários (ALHAMAWI et al., 2024; CLEMENTE-SUÁREZ et al., 2023).

E dentre as repercussões negativas mais conhecidas vinculadas a dieta ocidental alinhado a inatividade física está o aumento da incidência de obesidade e as complicações advindas dela (ALHAMAWI et al., 2024). A obesidade é uma das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) em elevada prevalência mundial e com ampla repercussão negativa na saúde humana, e está relacionado a mais de cinquenta doenças, além de contribuir negativamente para o impacto social, econômico e clínico no geral (LAM et al., 2023).

O quadro obesogênico é uma inflamação crônica, com acúmulo excessivo de tecido adiposo, o que acaba comprometendo a saúde e ocasionando significativas implicações metabólicas e sistêmicas. Apesar de ser vinculado majoritariamente ao consumo excessivo de calorias, é uma doença multifatorial, cujo desenvolvimento

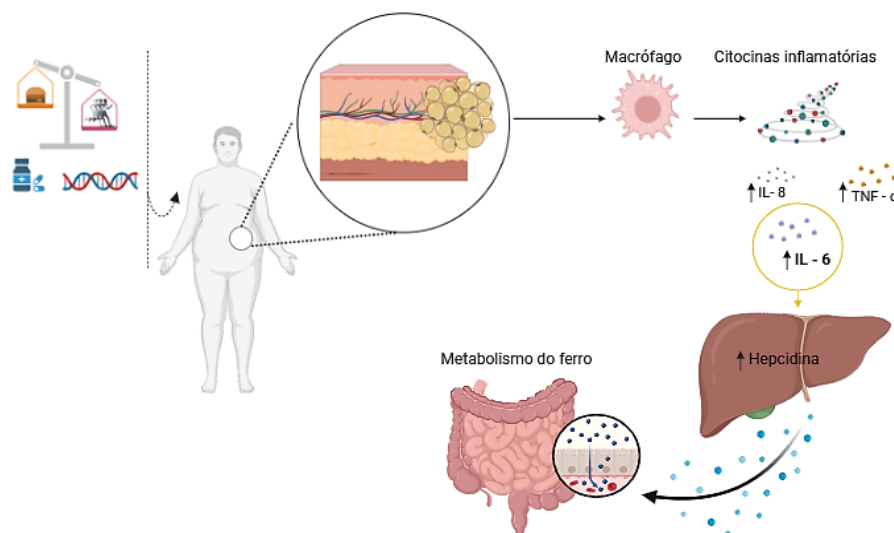
pode até mesmo decorrer de fatores genéticos, ambientais, socioculturais e comportamentais, tais como a inatividade física, status socioeconômico ou uso de medicamentos obesogênicos (BRASIL, 2023b, 2024b; CARVALHO; DUTRA, 2014).

No entanto, parece contraditório dizer que a obesidade esteja associada à deficiência de Fe e essa seja obviamente um fator de risco para doenças metabólicas, enquanto o excesso de Fe parece estar associado a riscos metabólicos (HILTON et al., 2023). Todavia, os quadros de inflamação crônica característico da obesidade, limitam a disponibilidade do mineral e contribui para a anemia causada por doenças crônicas, tornando o diagnóstico de deficiência mais complexo e exigindo um conhecimento aprofundado do metabolismo do Fe (DIGNASS; FARRAG; STEIN, 2018; LAL, 2020).

Com o excesso de tecido adiposo, ocorre o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , interleucina-6 (IL-6), IL8; proteínas de fase aguda, incluindo ferritina, proteína C reativa (PCR); aumento na produção de ROS e estresse oxidativo (CARVALHO; DUTRA, 2014; DIGNASS; FARRAG; STEIN, 2018; MARREIRO; CRUZ; MELO, 2020).

Conforme ilustrado na Figura 3, a liberação de IL-6 do tecido adiposo para o sangue pode estimular fortemente a síntese hepática de hepcidina que em níveis elevados, prejudica a homeostase do Fe, aumentando o risco de sua deficiência. Além disso, a hepcidina pode interferir na formação de proteínas essenciais ao metabolismo do Fe, como a transferrina e ferroportina (DIGNASS; FARRAG; STEIN, 2018; STOFFEL et al., 2020).

Figura 3. Quadro obesogênico e suas complicações ao metabolismo de ferro.



O consumo de dietas ricas em gordura e açúcar pode desencadear um quadro obesogênico, resultando em uma cascata de citocinas inflamatórias que podem ocasionar alterações metabólicas indesejadas, como a deficiência de ferro no organismo. Fonte: Autor.

Dessa forma, as condições inflamatórias podem pressupor a restrição de Fe para eritropoiese e alterações em outras funções, como no metabolismo glicídico e lipídico, resultando em sinais de homeostase metabólica interrompida. Além dessas alterações, quadros de intolerância à glicose, devido à secreção de insulina prejudicada e/ou aumento da resistência insulínica (RI), tornam-se o ponto de partida para mudanças no perfil lipídico, como o aumento dos níveis de triacilglicerídeos e redução dos níveis de HDL (*high-density lipoprotein*), o que pode acarretar as DCNT ou síndrome metabólica. Juntamente, essas alterações na sinalização da insulina conduzem a quadros de hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia (ABE; ISLAM; LAM, 2020; CARVALHO; DUTRA, 2014; DIGNASS; FARRAG; STEIN, 2018; SOLIMAN et al., 2017). Uma explicação para o desenvolvimento da RI em indivíduos obesos, estaria relacionada a ativação prolongada do receptor de insulina pelos ácidos graxos livres e pelo estresse celular que pode resultar na fosforilação da serina e na redução da fosforilação da tirosina do receptor de insulina substrato 1 (IRS1), atenuando a sinalização da insulina. Com isso, este mecanismo contribui para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 e da esteatose hepática não alcoólica (MAZZA; SANTANA; OLIVEIRA, 2009).

Outra condição atribuída ao quadro obesogênico é a Síndrome Metabólica (SM). Esta condição está associada a desordens metabólicas relacionadas à deposição de gordura e RI, e inclui três ou mais dos seguintes critérios: obesidade abdominal (≥ 90 cm para homens e ≥ 80 cm em mulheres); níveis elevados de triglicérides (≥ 150 mg/dL); HDL reduzida (< 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres); pressão arterial alterada ($\geq 130/\geq 85$ mmHg) e glicemia de jejum acima de 100 mg/dL (CARVALHO; DUTRA, 2014; ROCHA; LOPES; HERMSDORFF, 2016).

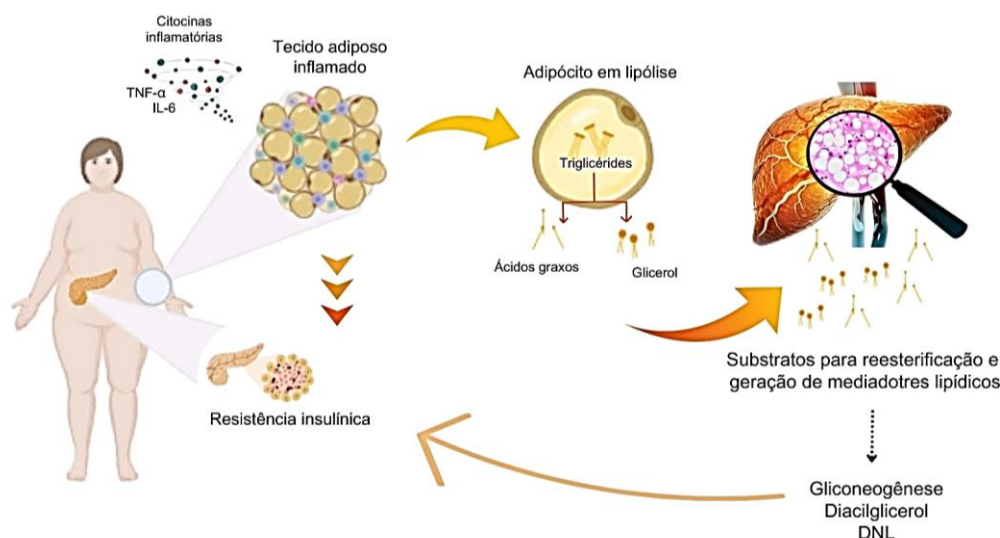
Ademais, a obesidade favorece a sobrecarga de Fe nos adipócitos através de macrófagos M1 que são característicos dessa subpopulação. Nível elevado de Fe no tecido adiposo inibe a adiponectina e a leptina sensibilizadoras de insulina e estimulam a resistina inibidora de insulina e a proteína de ligação ao retinol 4 e quando reduzido promove efeito contrário (FILLEBEEN et al., 2020).

No mesmo contexto da obesidade está a resistência insulínica (RI), que pode ser desencadeada por vários mecanismos. E quando esse desequilíbrio é crônico, pode resultar em disfunção do tecido adiposo, como o estímulo à lipólise excessiva, agravando ainda mais a resistência hepática à insulina e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). Em relação a DHGNA, devido à resistência insulínica, a energia pós-prandial acarreta a síntese de triglicerídeos hepáticos (RODEN; SHULMAN, 2019).

A DHGNA que é caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídios no fígado (esteatose), e tem crescido paralelamente ao aumento das taxas de obesidade (PAFILI; RODEN, 2021). Isso explicaria o motivo pelo qual essa condição estaria frequentemente associada a diabetes, dislipidemia, pressão arterial anormal, síndrome metabólica e outros distúrbios metabólicos como a RI. É importante salientar que a DHGNA pode ocorrer na ausência de quadros inflamatórios; pessoas que possuem RI ou têm tendência a desenvolvê-la também podem ser afetadas (JESUS et al., 2014; RONG et al., 2023).

O surgimento da esteatose, que é refletido por múltiplas vias (Figura 4), incluindo o acúmulo de tecido adiposo levando à lipólise excessiva dos triglicerídeos, aumentando o influxo de ácidos graxos livres, síntese e retenção de lipídios nos hepatócitos (MOREIRA et al., 2022). A RI oriundo da obesidade, pode reduzir a glicogênese, e em outra via, a RI pode originar da esteatose hepática, pois os ácidos graxos e glicerol liberados pela lipólise servem de substratos para mediadores lipídicos, aumentando a gliconeogênese a partir do glicerol e lipogênese de novo (DNL). Ou seja, a hiperglicemia aparece como resultado da RI em nível muscular e hepática, e o pâncreas secreta mais insulina em resposta à resistência periférica e hepática à insulina, levando à hiperinsulinemia. Ressalta-se, que as citocinas inflamatórias oriundas do tecido adiposo disfuncional também podem estar relacionadas a RI (DEWIDAR et al., 2020; PAFILI; RODEN, 2021).

Figura 4. Mecanismo esteatose hepática.



O surgimento da esteatose pode se originar da lipólise excessiva que leva ao acúmulo de lipídios no fígado e da resistência insulínica aumentando a gliconeogênese. As citocinas podem atuar interferindo na resistência hepática à insulina e oxidando negativamente os ácidos graxos, ou ainda induzindo a lipogênese. Fonte: Autor.

As citocinas inflamatórias são capazes de ativar quinases celulares que fosforilam resíduos de serina no substrato do receptor de insulina. Indivíduos com RI apresentam maior aumento de diacilgliceróis (DAG) e atividades da proteína quinase C-teta, crucial na mediação da resistência hepática à insulina. Uma vez ativado pelo DAG, essa quinase transloca para a membrana celular e fosforila o resíduo específico de treonina no receptor de insulina, levando à desestabilização da configuração ativa de receptor de insulina quinase e inibição de sua atividade de tirosina quinase. Outra relação inflamatória envolve macrófagos que secretam IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória que regula negativamente uma chave para a oxidação de ácidos graxos (DEWIDAR et al., 2020).

A lipogênese também está relacionada à produção de citocinas induzidos por macrófagos M1, que são inflamatórios. As proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBPs) são expressas em M1, sendo a SREBP-1a a mais expressa. As SREBPs são fatores de transcrição que regulam a lipogênese via acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase, responsáveis pelas primeiras etapas da DNL (DEWIDAR et al., 2020; VASSILIOU; FARIAS-PEREIRA, 2023).

Outra ligação entre quadro de obesidade e esteatose está relacionado a distúrbios mitocondriais, devido à maior taxa respiratória presente geralmente em

indivíduos obesos com RI e fígado gorduroso. Juntamente com hiperglicemia e sobrecarga lipídica, isso induz uma cascata de sinalizações. A resposta proteica desdobrada (UPR), uma opção para restaurar o estresse do retículo endoplasmático (ER), pode ativar as vias de resistência à insulina, esteatose hepática e inflamação quando prolongada (DEWIDAR et al., 2020).

Em termos de caracterização, a esteatose pode ser microvesicular, geralmente a disfunção hepática grave, estando relacionada com a β -oxidação dos ácidos graxos livres, ou macrovesicular, resultante de alterações fisiopatológicas crônicas, como redução da secreção hepática lipídica (JESUS et al., 2014).

Entre os tratamentos para DHGNA, destaca-se a regulação do metabolismo lipídico e glicídico como forma de proteger o fígado. As intervenções no estilo de vida, tais como a melhoria da qualidade da dieta e a adequação alimentar são abordagens não medicamentosas essenciais no manejo da doença (JESUS et al., 2014; RONG et al., 2023). Dentre a intervenção dietética estaria o aumento de alimentos funcionais como o feijão, pois os metabólitos microbianos intestinais que podem ser produzidos a partir de compostos dessa leguminosa são considerados mediadores importantes na manutenção do equilíbrio do eixo intestino-fígado (FENG et al., 2023).

Resumidamente, pessoas com DHGNA apresentam frequentemente obesidade e/ou RI e diabetes tipo 2, e esses fatores estão associadas geralmente à disbiose intestinal. A disbiose pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal, permitindo que endotoxinas (como lipopolissacarídeos) alcancem o fígado, causando danos aos hepatócitos, inflamação e fibrose. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ou seja, os metabólitos, podem ajudar na manutenção da barreira intestinal mediando a inflamação (LANG; SCHNABL, 2020).

Considerando o impacto da obesidade na população e a deficiência de ferro, frequentemente associada ao consumo em excesso de alimentos densamente calóricos ou à falta de acesso a alimentos nutritivos ou, a dieta é a primeira linha de defesa e a principal fonte de ferro. Acredita-se que as propriedades funcionais de grupos alimentares, combinadas com uma dieta equilibrada, podem auxiliar na regulação do peso corporal e no estado metabólico (AVNEE et al., 2023; ROCHA; LOPES; HERMSDORFF, 2016). Em especial, as leguminosas são destacadas por seus componentes que beneficiam os perfis lipídicos e glicídicos, além de seu baixo índice glicêmico, que influencia a glicose pós-prandial, contribuindo para a redução de

manifestações metabólicas indesejáveis (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; COSTA et al., 2016).

O Guia Alimentar para a População Brasileira ressalta a importância de uma alimentação nutricionalmente balanceada, incluindo o consumo alimentos *in natura* ou minimamente processados, em grande variedade e predominantemente de origem vegetal (BRASIL, 2014). Partindo desse princípio, novas fontes de ferro com origem vegetal com boa biodisponibilidade estão sendo exploradas. Leguminosas como o feijão-caupi, além de fazer parte de programas de biofortificação, enquadram-se no grupo de alimentos *in natura* e constituem uma alternativa de baixo custo, com boa qualidade nutricional e sustentável para melhorar a qualidade da alimentação da população (EMBRAPA, 2024; SILVA, 2022).

3.4. Biofortificação

Micronutrientes essenciais como Fe, Zn e vitamina A são importantes para o desenvolvimento e crescimento humano, e são cruciais em muitas funções metabólicas. No entanto, a deficiência destes afetam milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo, portanto, alvos para a biofortificação (ANTUNES et al., 2019; JHA; WARKENTIN, 2020).

A biofortificação é uma estratégia para combater a deficiência de micronutrientes, desnutrição, fome oculta e melhorar o perfil nutricional de alguns alimentos (SHEORAN et al., 2022). Essa abordagem baseia-se na melhoria do perfil nutricional de alimentos vegetais por meio de intervenções agrônomicas, biotecnologia e melhoramento vegetal convencional, para que pessoas sem acesso a uma dieta saudável e diversificada possam obter produto alimentar final com maior teor de minerais e outros micronutrientes (LIBERAL et al., 2020). Ademais é considerada a solução mais sustentável, podendo contribuir para a maior biodisponibilidade e biacessibilidade de micronutrientes como o Fe nos alimentos (OFORI et al., 2022).

Em termos de alcance dos alimentos biofortificados, aproximadamente 4,6 milhões de famílias cultivam arroz e trigo ricos em Zn, cerca de 3 milhões de famílias na África sub Saara e América Latina se beneficiam do feijão rico em Fe e 2,6 milhões de pessoas na África Subsaariana e no Brasil comem mandioca rica em pró-vitamina A (DWIVEDI et al., 2023).

No Brasil o programa de biofortificação começou a partir de 2003, entre Programa HarvestPlus e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), tendo como objetivo inicial as culturas da mandioca, feijão e milho devido ao potencial agrônomo e maior valor nutricional e em 2006 o feijão-caupi foi inserido no projeto (NUTTI, 2011). Atualmente a rede BioFORT é responsável pela biofortificação de alimentos no Brasil, e é coordenada pela Embrapa, e conta com 15 unidades Embrapa, além das parcerias com universidades, institutos de pesquisa, prefeituras, governos estaduais e associações de produtores, e tem como foco o melhoramento do arroz, feijão, feijão-caupi, mandioca, batata-doce, milho, abóbora e trigo para aumento dos teores de Fe, Zn e vitamina A na dieta da população mais carente (EMBRAPA, 2024).

O Programa HarvestPlus majoritariamente adota a abordagem do melhoramento convencional, pois é um meio mais rápido para obter colheitas mais nutritivas nas mãos de agricultores e consumidores; não enfrenta obstáculos regulatórios e é amplamente aceito. Nesse método plantas da mesma espécie são selecionadas no campo e aquelas com maiores teores de nutrientes desejados e melhores características agrônômicas seguem para serem cruzadas e reavaliadas (EMBRAPA, 2023).

3.5. Feijão

O feijão é uma leguminosa de grande importância para a alimentação e nutrição humana, sendo amplamente consumido no México, América Central, América do Sul e em vários países africanos (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; FERREIRA; BARRIGOSI, 2021; GRDEÑ; JAKUBCZYK, 2023). A FAO (2023) menciona que apesar de ser uma fonte de proteína mais barata em comparação às de origem animal, o consumo de feijão vem diminuindo. No Brasil, entre 2013 e 2019, houve uma queda no consumo de feijão *in natura* de 72% para 68,3%. Dentre as causas desse decaimento, tem-se a substituição por alimentos de preparo mais rápido, acessível e conveniente (BRASIL, 2024a; JÚNIOR et al., 2024).

Além de ter um impacto socioeconômico significativo, o feijão desempenha um papel crucial na segurança alimentar global e no combate à pobreza e à fome (FAO, 2023; FELIPE et al., 2023; FERREIRA; BARRIGOSI, 2021). No Brasil, o feijão é um alimento básico, consumido diariamente junto com o arroz, caracterizando a cultura

alimentar brasileira (FAO, 2023; FELIPE et al., 2023; FERREIRA; BARRIGOSS, 2021).

Existem dois principais tipos de feijão, o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e o feijão caupi (*Vigna unguiculata*). No que diz respeito ao consumo no Brasil, 80% são de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e 20% são de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (JÚNIOR et al., 2024). O feijão-caupi possui origem africana e foi introduzido no Brasil pelos primeiros colonizadores portugueses no século XVI, mais precisamente na Bahia, e daí em diante acompanhou a colonização se disseminando por outros estados. É classificada cientificamente como planta *Dicotyledonea*, da ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolineae*, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, seção *Catyang*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e subespécie *unguiculata*, subdividida em *Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilistem* (FILHO et al., 2011). A leguminosa é consumida principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e é uma das cultivares alvos da biofortificação com Fe, que busca reduzir a alta prevalência de anemia ferropriva nessas regiões (SANT'ANA et al., 2019).

O feijão-caupi tem vários nomes populares: feijão-macassa e feijão-de-corda, na região Nordeste; feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada, na região Norte; feijão-miúdo, na região Sul. Na região Norte, há ainda um tipo importante para a culinária local chamado de manteiguinha, que tem grãos de cor creme e muito pequenos. No Estado da Bahia e norte de Minas Gerais é chamado de feijão-gurutuba e feijão-catador. E há um tipo de grão que tem o tegumento branco com um grande halo preto, que é chamado de feijão-fradinho nos estados de Sergipe, Bahia e Rio de Janeiro (FILHO et al., 2011).

A atenção de consumidores e pesquisadores voltado para o feijão-caupi está crescente, devido às suas propriedades benéficas à saúde. Os mecanismos de prevenção de doenças crônicas estão associados à presença de fibras alimentares solúveis e insolúveis, fitoquímicos, proteínas e peptídeos (JAYATHILAKE et al., 2018). Atualmente a importância econômica dessa cultura do feijão-caupi também vem crescendo, pois, seu cultivo é feito tanto por pequenos como por médios e grandes produtores com uso da alta tecnologia. Outro ponto importante, é seu papel na nutrição humana como estratégia de combate à insegurança alimentar e nutricional,

principalmente em áreas menos favorecidas (JÚNIOR et al., 2024; FERREIRA et al., 2022).

3.5.1. Propriedades funcionais do feijão

Há inúmeros estudos evidenciando os efeitos benéficos do feijão ao organismo (LIMA et al., 2019; HERNANDEZ-VELAZQUEZ et al., 2020; LIYANAGE et al., 2018), conforme evidenciado na Tabela 1. Quando incorporados em dietas rica em gordura por exemplo, podem modular o metabolismo do colesterol ou ainda atenuar quadros inflamatórios e melhorar a saúde intestinal dentre outros inúmeros benefícios (LIYANAGE et al., 2018; MONK et al., 2021). Em parte, essas contribuições positivas se dão por conta de seus componentes, considerando que a leguminosa é altamente nutritiva, pois possui alto teor de proteínas de fácil digestão (20–32%), carboidratos (53,3–67,1%), baixo teor de lipídios (0,71–1,85%), e adicionalmente possui minerais como Fe, fibras alimentares, fitatos, saponinas, vitaminas e compostos bioativos, incluindo polifenóis, polissacarídeos e peptídeos, além do amido resistente que tem efeitos semelhantes a fibra alimentar solúvel, tornando-o assim um alimento popular com propriedades funcionais (ALFARO-DIAZ et al., 2023; CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; MEHTA; RAO; SAINI, 2021; VIEIRA et al., 2023).

Outro aspecto relevante é que a população mundial e o *stress* ambiental estão cada vez maior e de forma semelhante a demanda por proteínas continua a crescer, assim como a desnutrição energética-proteica (DEP) que vem atingindo cerca de 6 milhões de pessoas ao redor do mundo. Situações como estas estão levando a uma maior demanda por produtos alimentares ricos em nutrientes e mais sustentáveis (SHEN; HONG; LI, 2022; ZHU et al., 2024). Ressalta-se que além do baixo custo, leguminosas, tais como o feijão-caupi, tendem a ser uma cultura multifuncional, pois são fontes viáveis de proteínas de alta qualidade por terem propriedades benéficas para a saúde humana quando comparadas às fontes de proteína animal, incluindo reduções nos fatores de risco para doenças cardiovasculares e contribuições para o aumento da saciedade, além de ser uma planta resiliente, contribuiu para a sustentabilidade e possui benefícios agrônômicos mesmo em condições de mudança climática (FERREIRA et al., 2022; MEKONNEN et al., 2022; NOSWORTHY et al., 2023; ZHU et al., 2024).

Logo, a inclusão da leguminosa na dieta humana, se consumido regularmente, pode ser uma estratégia positiva, proporcionando melhora do perfil glicêmico e lipídico, da hipertensão arterial. Pode ainda, atuar na redução do risco do câncer e melanogênese, assim como exercer atividades hepatoprotetoras, atenua o quadro obesogênico, a inflamação de baixo grau, favorecer a microbiota intestinal saudável e ainda gerenciar o risco de doenças relacionadas ao sistema imunológico (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; HOU et al., 2019; MULLINS; ARJMANDI, 2021).

Mullins e Arjmandi (2021), são incisivos quando mencionam que o comportamento alimentar é um fator de risco mutável muito importante, e que os padrões alimentares baseados em vegetais favorecem a saúde e atenua doenças através do perfil nutricional e compostos bioativos, incluindo os fitoquímicos.

Tabela 1. Efeitos funcionais do feijão.

Referência bibliográfica	Nome cultivar	Modelo de estudo	Tempo de intervenção	Resultado
Liyanage et al. (2018)	Feijão-caupi “Bombay” e “MI35	Ratos machos	6 Semanas	↑ HDL-c, peso fecal e conteúdo cecal, população de <i>Lactobacillus</i> cecal; ↓ Peso do fígado, pH, colesterol sérico, triglicérides.
Nguyen et al. (2019)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Hamsters	4 Semanas	↓ Síntese hepática de colesterol, absorção intestinal de colesterol, colesterol plasmático, fração não-HDL; ↑ Excreção fecal de colesterol; Manutenção das concentrações do HDL.
Kilua et al. (2020)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ratos machos	4 Semanas	↓ Colesterol sérico; ↑ Propionato; Modulação da microbiota intestinal e na fermentação fecal.

Zhao et al. (2021)	<i>Vigna angularis</i>	Camundongos machos	12 Semanas	↓ Danos à função hepática e a esteatose hepática; ganho de peso, do acúmulo de lipídios, níveis séricos de lipídios e lipopolissacarídeos; ↑ Sensibilidade à insulina; Melhora da homeostase da glicose e reversão dos desequilíbrios da microbiota intestinal.
LI et al. (2022b)	Feijão mungo	Ratos machos	5 Semanas	Regulação da microbiota intestinal; ↓ Peso corporal, ganho de peso, hiperglicemia, hiperlipidemia, resistência à insulina, inflamação, alterações oxidativas, danos ao fígado e rins.
Ashraf et al. (2020)	<i>Vigna radiata</i> , <i>Faseolus vulgaris</i>	Digestão <i>in vitro</i>	-	Potencial para inibição da síntese de colesterol e sua solubilidade na micela. Atividade antioxidante. Alternativa de aplicação nas indústrias alimentícia e nutracêutica.
Liu et al., (2019)	<i>Vigna radiata</i> L, <i>Pisum sativum</i> L (ervilha)	Ratos machos	4 Semanas	Melhora do perfil lipídico sérico e hepático, do sistema de defesa antioxidante e da expressão genética antioxidante.
		<i>In vitro</i>	-	Altas atividades antioxidantes.
		Células HepG2	-	Possibilidade de restauração dos níveis de lipídios intracelulares, malondialdeído e atividades de enzimas antioxidantes em células HepG2 induzidas por ácido oleico.
Kitano-Okada et al. (2019)	<i>Vigna angularis</i>	Humanos	8 Semanas	↑ HDL-c após 4 semanas.

Wang et al. (2020)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Humanos	35 Dias	↑ Perda de peso do grupo de feijão (2,24kg) em relação ao placebo (0,29kg); ↓ IMC, gordura corporal e espessura da gordura subcutânea.
Doma et al. (2021)	Feijão preto, Navy, Pinto beans, Dark red kidney, feijão branco	Humanos	4 Semanas	↓ Colesterol total e LDL-c.
Escobedo et al. (2021)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L	Humanos	4 Semanas	↓ Apolipoproteína B-100; Sem efeito nos parâmetros lipídicos ou glicêmicos.

3.5.2. Fibras alimentares e fatores complexantes de minerais

O feijão-caupi é rico em nutrientes e compostos bioativos promotores da saúde, como a fibra alimentar. Um estudo proposto por Akissoé et al. (2023), realizado no sul de Benim revelou que o consumo médio de 58g a 71g de feijão-caupi por adulto ao dia contribui com 42% da ingestão diária recomendada de fibra alimentar. A ingestão de carboidratos não digeríveis, como fibras alimentares, pode impactar positivamente a saúde, ajudando a prevenir anormalidades associadas à obesidade (MONK et al., 2021).

As fibras alimentares são definidas como polissacarídeos e lignina originários de alimentos vegetais resistentes à hidrólise das enzimas digestivas humanas, e que apresentam somente ligações do tipo beta, e as enzimas humanas clivam somente ligações do tipo alfa, presentes no amido (LOTTENBERG; UONACORSO, 2009). Dentre os pontos positivos do consumo de fibras alimentares, podemos citar a atenuação do desenvolvimento de DCNT, além de outras múltiplas patologias (BARBER et al., 2020; KILUA et al., 2020). São classificadas de acordo com a sua solubilidade na água, sendo elas solúveis e insolúveis (PRASAD; BONDY, 2019).

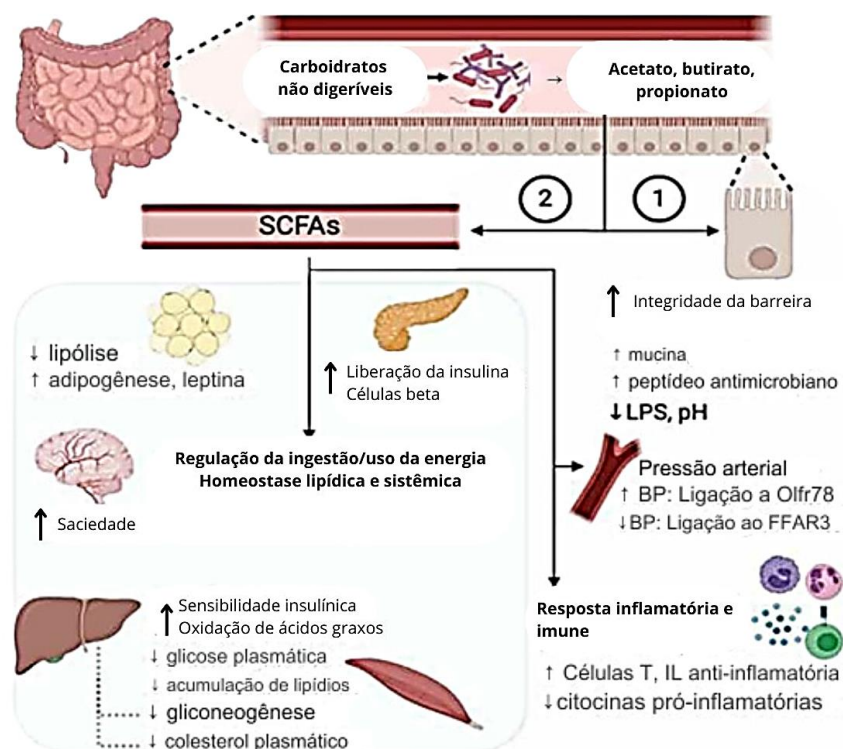
As fibras alimentares solúveis permitem o aumento do bolo fecal; maior excreção de lipídios nas fezes; reduzem o esvaziamento gástrico com efeito de saciedade mais duradouro; e devido a viscosidade, a digestão e absorção da glicose

e lipídios fica mais lenta (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016). Elas absorvem água formando um gel no intestino e são fermentadas no cólon pelas bactérias probióticas de forma mais rápida, e essa capacidade de fermentação contribui para a saúde da microbiota intestinal, pois com isso são produzidos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o propionato, butirato e acetato, que funcionam para manter a homeostase intestinal e desempenham papéis essenciais numa ampla gama de funções biológicas. Podem impactar no metabolismo lipídico, glicídico, proliferação celular, na inflamação e na funcionalidade do sistema imune (LI et al., 2023; PRASAD; BONDY, 2019).

Esses AGCC produzidos através da fermentação são rapidamente absorvidos (de 90 a 95%), sendo oxidados ou metabolizados no fígado (FILISSETTI; LOBO; COLLI, 2020). O butirato, ácido graxo de 4 carbonos, que é rapidamente absorvido pelo intestino, pode aumentar a apoptose e suprimir crescimento de células cancerígenas, além aumentar os níveis de insulina celular e a sua produção (MATHERS, 2023; PRASAD; BONDY, 2019). Já o propionato desempenha papel crucial na redução dos lipídios, colesterol sérico, e no comportamento alimentar, visto que pode aumentar a liberação do peptídeo YY, que relacionado com a inibição do apetite. E o acetato induz a apoptose, e assim como o propionato está relacionado a redução do apetite (PRASAD; BONDY, 2019).

Ademais, os AGCC desempenham um papel vital na regulação imunológica e inflamatória, promovendo a diferenciação de células T e influenciando a liberação de citocinas anti-inflamatórias. Eles também afetam a absorção de minerais, aumentando a solubilidade dos minerais e estimulando sua absorção devido à redução do pH luminal (Figura 5) (FILISSETTI; LOBO; COLLI, 2020; LI et al., 2023).

Figura 5. Vias de atuação dos ácidos graxos de cadeia curta.



Os AGCC produzidos pela fermentação bacteriana a partir de carboidratos não digeríveis no intestino grosso modulam inúmeros processos fisiológicos, incluindo mediadores metabolismo lipídico, glicídico, transdução de sinal alterada e regulação da expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos e mediados por fatores de transcrição. Fonte: Adaptado de Mathers (2023).

O aumento da ingestão de fibras alimentares solúveis representa uma pequena contribuição, que junto à alimentação saudável e ao uso de outros alimentos funcionais podem colaborar para a promoção da saúde, como na redução do colesterol, que assume um importante papel no desencadeamento da gênese da aterosclerose e das doenças cardiovasculares (DCV) (LOTTENBERG; UONACORSO, 2009). No entanto, a ingestão inadequada de fibra alimentar pela maioria das populações ao redor do mundo continua sendo um desafio de urgente de saúde pública (MATHERS, 2023).

Porém, os alimentos à base de plantas contêm concentrações de substâncias que podem afetar negativamente as vias metabólicas, pois formam complexos de interação que reduzem a digestibilidade de carboidratos, proteínas e dificultam a biodisponibilidade e absorção de minerais como Fe. Dentre os complexantes podemos citar os taninos, fitatos, polifenóis, saponinas, lectinas e inibidores de proteases (ANDERSON, 2020; CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; RODRÍGUEZ-

ESPAÑA et al., 2022). Entende-se por biodisponibilidade a absorção ou captação do nutriente pela mucosa intestinal; transporte; assimilação celular e a conversão de um nutriente em sua forma biologicamente ativa (COSTA; MARTINO, 2011).

O fitato (hexafosfato de mio-inositol [IP6]), é a principal forma em que a planta armazena fósforo, em leguminosas como o feijão-comum pode variar de 0,6 a 2,7%, e no processo de germinação a enzima fitase é ativada e o fitato é degradado, melhorando assim a bioacessibilidade e biodisponibilidade mineral (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; ELLIOTT et al., 2022). Os taninos são produtos condensados de polifenóis, reagem covalentemente com grupamentos épsilonamino dos resíduos de lisina, inibindo a quebra dessa ligação peptídica catalisada pela tripsina, e seu efeito adstringente confere a ele a capacidade de precipitar proteínas, e dessa forma indiretamente reduzir a absorção de minerais (COQUEIRO; BONVINI; TIRAPEGUI, 2020).

Ainda, os polifenóis ou compostos fenólicos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, e são considerados metabólitos secundários das plantas. Nas plantas, eles exercem função de fotoproteção, defesa contra microrganismos e insetos, além de serem responsáveis pela pigmentação e por algumas características organolépticas dos alimentos. E são os que mais contribuem para a baixa digestibilidade do feijão por conta do complexo formado com as proteínas (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; HORST; CRUZ; LAJOLO, 2020). Os alimentos ricos em polifenóis reduzem a biodisponibilidade de Fe das refeições, e alimentos ricos nesses compostos como os feijões, café e uvas também inibem a absorção do mineral (MILLER, 2019).

Para mitigar a concentração desses fatores complexantes e aumentar a biodisponibilidade de outros nutrientes em leguminosas como o feijão alguns processos podem ser adotados. No estudo de Abera; Yohannes e Chandravanshi (2023), o ácido fítico reduziu 12-16% na embebição e no cozimento teve uma diminuição de 37-38%, já o tanino, mostrou um decréscimo de 23-30% na embebição, seguido de 21-41% durante o cozimento. Sant'Ana et al., (2019), em seu estudo com feijão-caupi, observou que a bioacessibilidade *in vitro* do feijão germinado apresentou valores mais elevados em comparação com cozimento.

No entanto, apesar de reduzirem absorção de minerais, estes compostos podem trazer efeitos benéficos, e são capazes de modular diversas vias metabólicas (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016).

O fitato pode atuar em relação ao controle glicêmico, por ser capaz de regular a insulina através canais de cálcio e no perfil lipídico pode atuar na redução do colesterol e dos triacilgliceróis plasmáticos (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; RIBEIRO et al., 2019). Os polifenóis atuam como anti-inflamatórios; na prevenção da oxidação lipídica, evitando danos ao endotélio; em relação ao controle glicêmico atuam na inibição de enzimas (α -amilase e a α -glicosidase); estimulam a secreção de insulina e reduz sua produção; agem na captação de glicose; possuem efeito hipotensor e potencial quimiopreventivo, devido a capacidade de modular alterações epigenéticas em células cancerosas (GRANT; HAMILTON, 20013; RIBEIRO et al., 2019). A modulação de alguns destes parâmetros ajudam a reduzir o risco de diabetes e doenças cardiovasculares (VIEIRA et al., 2023). Assim, estes compostos apesar de não possuírem recomendações específicas de ingestão diária por parte das agências internacionais, eles representam uma estratégia em potencial para o manejo das DCNT (RIBEIRO et al., 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto desenvolveu-se nos laboratórios do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) e no Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus de Alegre, na região sul do Espírito Santo.

4.1. Matéria-prima

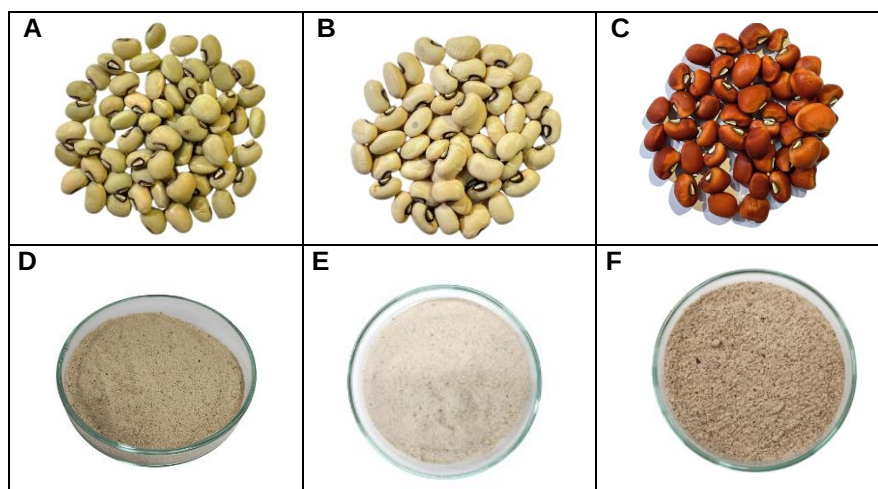
Para o estudo foram utilizados 3 cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), BRS Aracê e BRS Tumucumaque biofortificados com Fe, e cultivar convencional BRS Pajeú (Figura 6 A, B e C), fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Meio-Norte, Piauí.

O cultivar BRS Aracê pertencente ao grupo comercial cores, subclasse verde, o cultivar BRS Tumucumaque da classe comercial branco liso com tegumento na cor branco e liso com halo marrom e o BRS Pajeú classe cores, subclasse comercial mulato-claro (FILHO et al., 2011).

4.2. Processamento da matéria-prima

Os grãos de feijões-caupi foram inicialmente submetidos a uma seleção prévia para retirada de sujidades e lavados com água deionizada. Posteriormente foram cozidos sem imersão prévia em panela de pressão elétrica doméstica (ELGIN®, capacidade de 4 litros, modelo 42PPR1002000) na proporção de 1:2 (p/v), durante 50 minutos com água deionizada. Após o cozimento, os grãos juntamente com o caldo de cozimento foram resfriados e ficaram 24h no congelador em geladeira (Electrolux®, modelo Frost Free DF 48). Após esse período foram levados para o ultrafreezer (Thermo Scientific®, modelo REVCO EFX) a - 80°C por 48 horas, e em seguida liofilizados (JJ Científica®, modelo LIW) a 60°C por 24 horas. Posteriormente o conteúdo liofilizado foi triturado no liquidificador de inox (Colombo Premium®, capacidade de 2 litros, modelo AR) para obtenção de uma farinha fina. Foram utilizadas embalagens laminadas identificadas para o acondicionamento da farinha, protegidos da luz sob temperatura de -20°C (Electrolux®, modelo FE 26 vertical). A Figura 6 ilustra os grãos *in natura* (A, B e C) e após a obtenção da farinha (D, E e F).

Figura 6. Matéria-prima.



(A): BRS Aracê. (B): BRS Tumucumaque. (C): BRS Pajeú. (D): Farinha cultivar BRS Aracê. (E): Farinha cultivar BRS Tumucumaque. (F): Farinha do cultivar BRS Pajeú.

4.3. Análises físico-químicas

4.3.2. Composição centesimal e amido resistente

A determinação da umidade, cinzas, lipídios e proteína da farinha de feijão-caupi seguiu as metodologias da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2019), no qual a umidade foi determinada em estufa (Biopar®, modelo 580SD) a 105°C até obter o peso constante e o resíduo mineral referente as cinzas por meio da incineração em mufla (STECNO®) a 550°C por 6 horas.

O teor de lipídios foi determinado por extração em Soxhlet utilizando éter de petróleo como o solvente extrator. Para quantificar as proteínas foi utilizado o teor total de nitrogênio quantificado através do método de Kjeldahl, em que o teor de proteína foi calculado multiplicando-se o resultado encontrado de nitrogênio pelo fator 6,25 (AOAC, 2019).

O conteúdo de fibras alimentares solúveis e insolúveis foi quantificado pelo método enzimático-gravimétrico, utilizando kit comercial (*Total Dietary Fiber Kit*, Megazyme®). Para a hidrólise enzimática foi usado α -amilase termorresistente, protease e amiloglucosidase. Para a filtração utilizaram-se cadinhos de vidro com placa porosa e celite como auxiliar de filtração. A quantificação da fibra alimentar total foi determinada pela soma de fibras alimentares solúveis e insolúveis (ASP et al., 1983). O amido resistente foi mensurado utilizando-se o kit comercial da Megazyme® (Mega-Calc™, Resistant Starch (K-RSTAR)).

O teor de carboidrato foi calculado por diferença centesimal, subtraindo a soma do conteúdo de lipídios, proteínas, umidade, cinzas e fibra alimentar total por 100. Para cálculo do valor energético total da farinha dos feijões-caupi, os teores de carboidratos e proteínas obtidos foram multiplicados por 4 kcal/g e lipídeos por 9 kcal/g (MACLEAN et al., 2003).

4.3.3. Determinação do teor de ferro

O teor de Fe foi determinado com base na AOAC (2019), por espectrometria de absorção atômica, em que todas as vidrarias e instrumentos que entraram em contato com as amostras foram previamente desmineralizadas com ácido nítrico a 10% *overnight* e posteriormente lavadas com água deionizada. Inicialmente foi realizada a digestão de 0,5 g de amostra com 10 mL de ácido nítrico P.A. em equipamento de micro-ondas MARS 6 (CEM Corporation®). A etapa do micro-ondas envolveu três etapas:

1. Rampa de temperatura de 25 minutos até 210°C;
2. Manutenção da temperatura por 15 minutos a 210°C;
3. Descida de 15 minutos até temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água deionizada. As amostras foram lidas em espectrômetro de absorção atômica (SavantAA; GBC Scientific Equipment®), com curva padrão elaborada a partir de solução padrão de 1000 ppm.

4.3.4. Determinação fitato e tanino

Para a quantificação do teor de fitato utilizou-se kit comercial Mega-Calc™, Phytic Acid / Total Phosphorus (K-PHYT) da marca Megazyme®. O conteúdo de taninos foi mensurado utilizando os métodos de Burns (1971), pela reação vanilina/HCl e as absorbâncias medidas a 500 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific®). Para elaboração da curva padrão, foi utilizada a catequina e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente a catequina por grama de amostra seca (mg EC / g).

4.3.4.1. Razão molar fitato:ferro

Com os dados obtido das análises de Fe e fitato dos feijões, foi calculada a razão molar fitato:ferro, seguindo a fórmula abaixo, sendo 659,91 g/mol o peso molecular do fitato e 55,8 g/mol o peso atômico do ferro.

$$\text{Razão molar fitato:ferro} = \frac{\text{Teor de fitato (g)} / 659,91}{\text{Teor de ferro (g)} / 55,8}$$

4.3.5. Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

4.3.5.1. Preparo do extrato

De acordo com o método descrito por Lima et al. (2004), com algumas modificações, inicialmente pesou-se 0,5 g da amostra de farinha de feijão em um frasco Erlenmeyer. Em seguida, adicionou-se 20 mL de água deionizada a temperatura ambiente nas amostras. As amostras foram mantidas em agitação magnética (Kasvi®, modelo K 40) durante 60 minutos no escuro. Após esse período, foram filtradas utilizando-se uma bomba de vácuo (Tecnal®, Modelo TE-058) e os resíduos foram submetidos a um novo processo de extração, no qual foram adicionados mais 15 mL de água deionizada a temperatura ambiente e agitados novamente nas mesmas condições do procedimento descrito, totalizando 2 horas de extração. Por fim, as amostras foram filtradas novamente utilizando-se a bomba de vácuo e armazenadas em tubo Falcon identificados e protegidos com papel alumínio no freezer a -20 °C (Electrolux®, modelo FE 26 vertical) até o momento da análise.

4.3.5.2. Compostos fenólicos totais

Para a análise do teor de compostos fenólicos totais foi utilizado o método espectrofotométrico em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific®), a 760 nm, empregando o ácido gálico (entre 10 ppm e 130 ppm) para elaboração da curva padrão e o reagente Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente ao ácido gálico por grama de amostra seca (mg GAE / g) (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A curva-padrão resultante de ácido gálico utilizada para a análise de compostos fenólicos totais é representada pela regressão expressa por $y = 0,0083x + 0,0613$, apresentado um fator de correlação de 0,9989.

4.3.5.3. Capacidade antioxidante

Para determinação da atividade antioxidante utilizou-se extrato aquoso descrito no item 4.3.5.1., diluído na proporção 1:10.

4.3.5.3.1. Método ABTS (Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

Para medir a atividade antioxidante através da captura do radical ABTS foi utilizada metodologia adaptada de Rufino et al. (2007). Resumidamente em um tubo de ensaio sob ausência da luz foram adicionados 3 mL de solução ABTS e 30 µL do extrato aquoso do feijão-caupi. O conteúdo foi agitado por 10 segundos e, em seguida, mantido no repouso por 6 min. Após esse período, foi retirado uma alíquota de 200 µL e a absorbância foi lida em leitor de microplacas a 734 nm (Multiskan GO, marca Thermo Scientific).

Para a construção da curva padrão Trolox 2mM utilizaram-se concentrações entre 10 e 1500 µmol, sendo $y = -0,0003x + 0,7148$ $R^2 = 0,9904$. A atividade antioxidante total foi expressa em µM de equivalente Trolox por g de amostra. Álcool absoluto foi utilizado como branco para determinação da curva padrão e atividade antioxidante.

4.3.5.3.2. Método DPPH (Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazina)

O método espectrofotométrico adotado para determinação da capacidade antioxidante através do DPPH foi de Silveira et al. (2018), com modificações. A determinação da atividade antioxidante e da curva padrão de Trolox foram realizadas sob abrigo da luz, no qual transferiu-se 150 µL do extrato aquoso diluído dos feijões ou de cada concentração do Trolox para tubos de ensaio contendo 5,85 mL de solução de uso de DPPH, a mistura foi homogeneizada e a absorbância dos tubos (515 nm) foi obtida após 30 minutos. Em relação a atividade antioxidante das amostras, um tubo foi preparado com álcool etílico em substituição ao extrato para controle negativo. A curva padrão do Trolox iniciou-se com o preparo das diluições a partir da solução padrão de Trolox (2 mM). Foram preparadas soluções de concentrações de 100 µM a 800 µM, sendo $y = -0,0005x + 0,5031$ $R^2 = 0,9936$. Álcool absoluto foi usado como branco para curva padrão e leituras das amostras.

4.4. Ensaio biológico

4.4.5. Comissão de ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEAU/UFES), sob protocolo nº 013/2022, pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ES, campus Alegre, Brasil (Anexo A).

4.4.6. Delineamento experimental

O número de repetições por tratamento foi de 12 animais. A mensuração amostral utilizou-se o cálculo do “n” amostral conforme citado por Fontenelles et al. (2010), que é um método rotineiro e fácil de calcular o tamanho da amostra, considerando $\alpha=5\%$, e portanto, um $Z_{\alpha/2}=1.96$ utilizando a seguinte equação:

$$n = \frac{s^2}{(\bar{x} - \mu)^2} \times (z_{\frac{\alpha}{2}})^2$$

Em que:

n: número de animais por grupo.

s^2 : variância dos dados de referência.

$\bar{x} - \mu$: diferença máxima razoável.

$z_{\alpha/2}$: erro alfa do tipo I, na área das ciências da saúde geralmente é estimado em 5%.

Para confirmar o cálculo de amostra utilizou-se dados de um estudo publicado de Liyanage et al. (2018), no qual usou a suplementação de feijões-caupi em uma dieta rica em gordura com ratos Wistar machos.

Utilizando-se dados do peso inicial tem-se:

$$n = (16,88)^2 \div (10)^2 \times (1,96)^2 = 10,95 \text{ animais}$$

Considerando o ganho de peso:

$$n = (15,435)^2 \div (9)^2 \times (1,96)^2 = 11,30 \text{ animais}$$

Levando em consideração que esse cálculo pode produzir uma discreta subestimação no tamanho amostral segundo Fontenelles et al. (2010), e as possíveis perdas que podem ocorrer durante um experimento, utilizamos 12 animais por tratamento, considerando 5 tratamentos, foram necessários 60 animais.

Neste estudo, foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), recém-desmamados, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus Maruípe, com peso médio de $126,6 \pm 12,52$ g. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de aço inoxidável, com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas no Laboratório – Multiusuário de Experimentação Animal (LABMEX), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus Alegre, e receberam água deionizada *ad libitum* durante todo o experimento. Em todo período experimental, o peso dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente. No monitoramento do consumo alimentar foi considerado as sobras das dietas nos comedouros e a desperdiçada pelo animal na gaiola para não superestimar o consumo (COSTA, 2014).

A estimativa da biodisponibilidade do Fe se deu através da metodologia de depleção/repleção da hemoglobina com adaptações, em que a depleção de ferro (dieta isenta de ferro) ocorreu por 21 dias e a repleção (dietas com fontes de ferro) ocorreu por 35 dias. Durante toda a fase experimental com duração de 56 dias, os animais receberam a dieta AIN-93G recomendada para roedores conforme preconizado pelo *American Institute of Nutrition* com algumas adaptações (COSTA, 2014; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). As dietas ofertadas se basearam em duas opções, sendo elas normocalórica (ND) ou rica em gordura e açúcar (HD), sendo essa última com teor de 30% de lipídio, tendo como fonte principal a banha de porco e 30% de carboidrato proveniente de açúcar refinado de mesa (sacarose).

Assim, esse modelo experimental com uma exposição a dietas ricas em gordura e açúcar pode ser capaz de levar a efeitos negativos, tais como alterações nas atividades metabólicas e sistêmicas, o que mimetiza as dietas ocidentais humanas (ABDESSELAM et al., 2015; THANARAJAH et al., 2023).

4.4.6.1. Fase da depleção

Na fase de depleção com duração de 21 dias, os animais foram divididos em dois grupos e receberam alimentação *ad libitum* isenta em Fe para induzir a anemia ferropriva, sendo eles:

Grupo ND ($n=12$) com dieta normocalórica isenta de Fe.

Grupo HD ($n=48$), dieta rica em gordura e açúcar isenta de Fe.

Ao final da depleção, no dia 21, utilizando kit comercial (Labtest®, Ref.: 43) e seguindo as orientações do fabricante, foi determinada a concentração de hemoglobina. Amostras de sangue foram coletadas por gotejamento após secção da extremidade da cauda dos animais. A confirmação do estado anêmico se deu por meio da concentração de hemoglobina <12mg/dL (COSTA; MARTINO, 2014).

4.4.6.2. Fase da repleção

Para a avaliação da biodisponibilidade com a metodologia adaptada de depleção/repleção da hemoglobina os grupos testes foram comparados ao grupo controle, que recebeu sulfato ferroso (FeSO_4) (AOAC, 1998).

Ao final dos 21 dias de depleção, os animais do grupo HD (n=48) foram randomizados e subdivididos em 4 grupos experimentais, de forma que a concentração da hemoglobina e peso fossem o mais próximo possível entre os grupos e sem diferença estatística. O estudo compreendeu 5 grupos de tratamentos, de modo a saber:

Grupo I: NS (n=12) com dieta normocalórica + FeSO_4 (antigo grupo ND da depleção).

Grupo II: HS (n=12): dieta rica em gordura e açúcar + FeSO_4 .

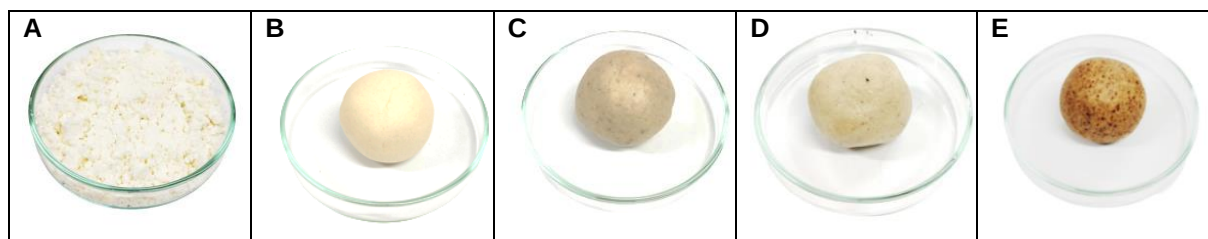
Grupo III: HA (n=12): dieta rica em gordura e açúcar + BRS Aracê.

Grupo IV: HT (n=12): dieta rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque.

Grupo V: HP (n=12): dieta rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú.

A dietas HS, HS, HT e HP foram ofertadas de maneira peletizada devido ao teor de gordura. As dietas referentes a cada tratamento estão evidenciadas na Figura 7.

Figura 7. Dietas experimentais da fase de repleção.

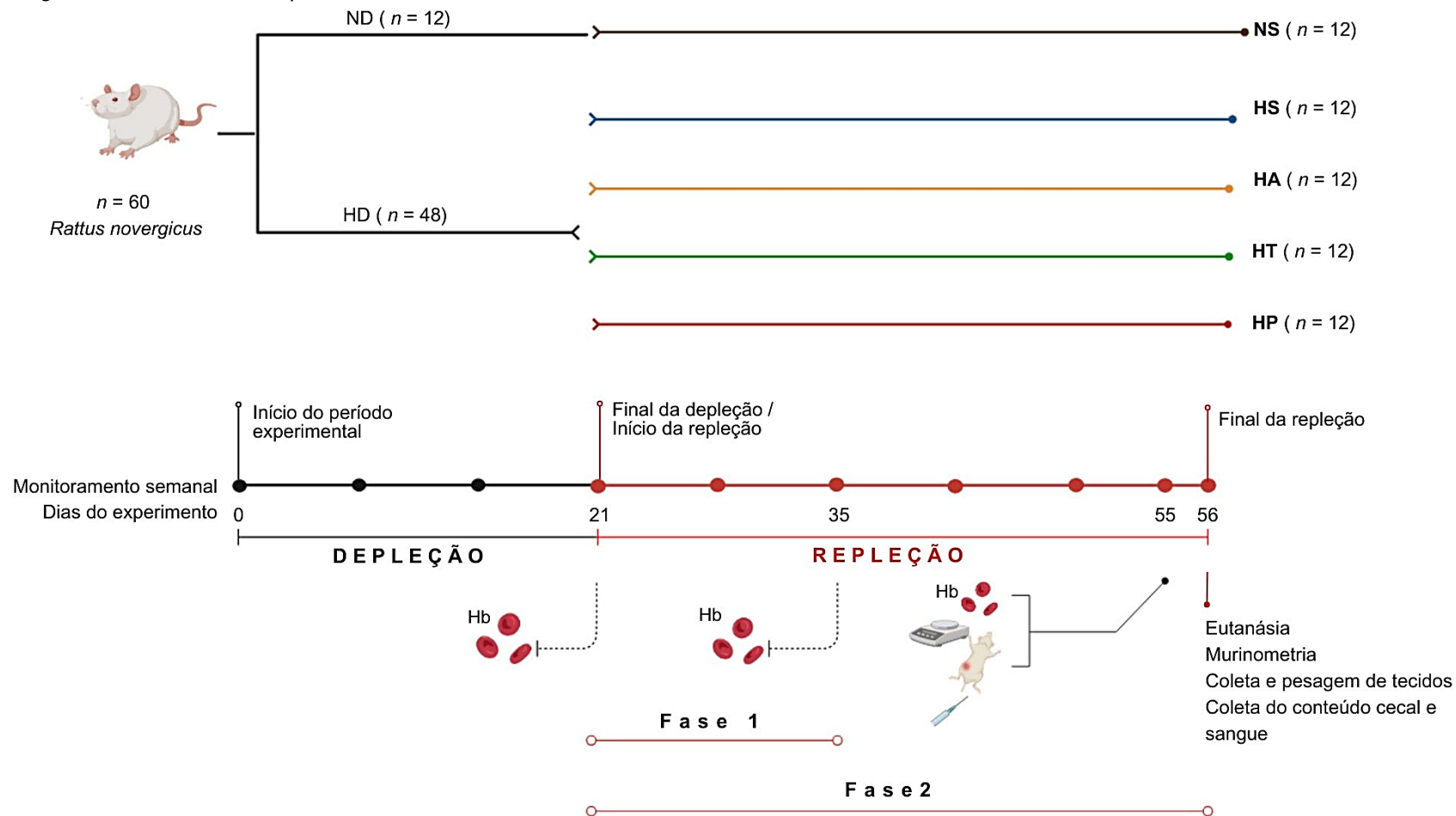


(A) NS: normocalórica + FeSO_4 . (B) HS: rica em gordura e açúcar + FeSO_4 . (C): HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. (D) HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. (E) HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú.

Adaptado do estudo de Liyanage et al. (2018), em que utiliza uma dieta rica em gordura em ratos Wistar suplementado com feijões-caupi, o tempo da fase de repleção se estendeu por 35 dias, com intuito de ocasionar alterações metabólicas. Foi dividida em fases 1 e 2 (Figura 8). Na fase 1 (14 dias), todos os grupos receberam suas respectivas dietas experimentais preparadas para terem o mesmo teor de Fe (12 mg/kg) proveniente dos feijões ou FeSO_4 . Durante esse tempo as dietas foram ofertadas diariamente de forma controlada com aproximadamente 18 gramas por dia. Após os 14 dias do início da repleção (final da fase 1), a hemoglobina foi avaliada novamente, utilizando o kit comercial (Labtest®, Ref.: 43), seguindo os mesmos procedimentos de coleta descritos anteriormente (COSTA; MARTINO, 2014).

Os animais seguiram com as mesmas dietas por mais 21 dias, totalizando 35 dias de repleção, que correspondeu à fase 2, e na última semana, foram coletadas fezes de 3 dias consecutivos das bandejas abaixo das gaiolas, e acondicionadas em recipientes individuais armazenadas sob temperatura de -80°C para extração lipídica total, análise do colesterol e triglicérides. No penúltimo dia do experimento (dia 55), após 12h de jejum, os animais foram pesados com auxílio de uma balança digital (modelo WPT 6C/1). Em seguida, realizou-se a análise de hemoglobina com um kit comercial (Labtest®, Ref.: 43) para averiguar possíveis distinções entre os tratamentos com o alimento teste, seguindo os mesmos procedimentos do item 4.4.6.1. Nesse mesmo dia, foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT) (Figura 8).

Figura 8. Delineamento experimental.



ND: normocalórica. HD: rica em gordura e açúcar. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. Hb: hemoglobina. Fase 1: compreendeu 14 dias após a repleção (entre o último dia depleção, dia 21, ao dia 35). A Fase 2 abrangeu todo o período da repleção, com duração de 35 dias (do dia 21 ao dia 56). A análise da Hb ocorreu no dia 21, 35 e no penúltimo dia (dia 55).

4.4.7. Dietas experimentais

As dietas ricas em gordura e açúcar foram preparadas com no máximo 15 dias de antecedência da sua utilização, com o intuito de evitar a oxidação lipídica. Cada ingrediente foi pesado individualmente em balança digital (Radwag®, modelo WPT 6C/1), e, logo após, os ingredientes referentes a cada dieta foram misturados manualmente, e em seguida homogeneizados em batedeira industrial (marca Venâncio®, modelo UBP 12) por 20 minutos. As dietas prontas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenados em geladeira (Electrolux®, modelo Frost Free DF 48). Todos os utensílios e equipamentos utilizados nas preparações foram lavados previamente com água deionizada para que fosse evitado a contaminação por Fe.

A partir da composição dos macronutrientes das farinhas dos feijões-caupi, todas as dietas foram ajustadas para apresentarem quantidades semelhantes de proteínas, fibra alimentar total, carboidratos, calorias e que fornecessem 12 mg/kg de Fe. Para os tratamentos controle positivo e negativo (HS e NS) utilizou-se a albumina como fonte proteica e o sulfato ferroso como fonte de Fe.

O teor de Fe e composição de macronutrientes está detalhada na Tabela 2:

Tabela 2. Composição das dietas experimentais.

Ingrediente (g/kg)	Depleção		Repleção				
	ND	HD	NS	HS	HA	HT	HP
Amido de milho ¹	397,5	-	390,18	-	-	-	-
Albumina	200	200	200	200	135,59	138,95	120,95
Sacarose	100	300	100	300	300	300	288,35
Amido dextrinizado	132	99,5	132	92,18	23,13	23,71	-
Banha de porco	-	230	-	230	230	230	230
Óleo de soja	70	70	70	70	65,14	65	63,33
Celulose	50	50	57,32	57,32	19,71	13,19	-
Mix de minerais ²	35	35	35	35	35	35	35
Mix de vitaminas	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3	3	3	3	3	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Feijão ^{3 e 4}	-	-	-	-	175,93	178,65	246,87
Sulfato ferroso ³	-	-	0,0596	0,0596	-	-	-
Composição das dietas							
Teor de Fe (mg/kg) ⁵	n.d.	n.d.	21,20	16,81	18,26	17,67	17,59
Lipídios totais (g/100g)	n.d.	n.d.	7	30	30	30	30
Proteína (g/100g)	n.d.	n.d.	15,25	15,25	15,25	15,25	15,25
Carboidrato (g/100)	n.d.	n.d.	62,22	39,22	39,73	39,64	39,53
Fibra Alimentar Total (g/100g)	n.d.	n.d.	5,73	5,73	5,73	5,73	5,73
VET (kcal/100g)	n.d.	n.d.	372,89	487,89	489,92	489,59	489,14

¹ Quantidade suficiente para fornecer 1 kg de dieta. ² Isento em ferro. ³ Quantidade suficiente para fornecer 12 mg de ferro por kg de dieta. ⁴ O preparo dos feijões dieta seguiu a metodologia descrita no tópico 4.2. ⁵ Teores determinados por espectrometria de absorção atômica. ND: normocalórica. HD = rica em gordura e açúcar. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. Fe: ferro. VET: Valor Energético Total. Kcal: quilocaloria ingerida. N.d.: não determinado ou não calculado.

4.4.8. Ganho de peso e de consumo alimentar

O monitoramento semanal do peso e do consumo alimentar possibilitou estabelecer a evolução de ambos as variáveis ao longo do estudo. E ao final do período experimental foram calculados: ingestão lipídica, média do ganho de peso total (ganho de peso total / *n*); a média do consumo alimentar total (consumo alimentar

total / n) e o consumo médio de Fe (consumo médio do grupo repleção x mg/Fe/kg dieta).

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi determinado pela expressão:
$$CEA = (\text{ganho de peso (g)} / \text{consumo alimentar (g)}) \times 100$$

E o coeficiente de eficiência energética (CEE) obtido pela razão entre o ganho de peso corporal final (g) e o consumo total de energia (kcal).

E a partir do peso corporal foi calculado o índice hepatossomático usando a seguinte equação:

$$\text{peso do fígado (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100.$$

E a partir do conteúdo total de fenólicos dos feijões-caupi foi calculado a ingestão total desses compostos.

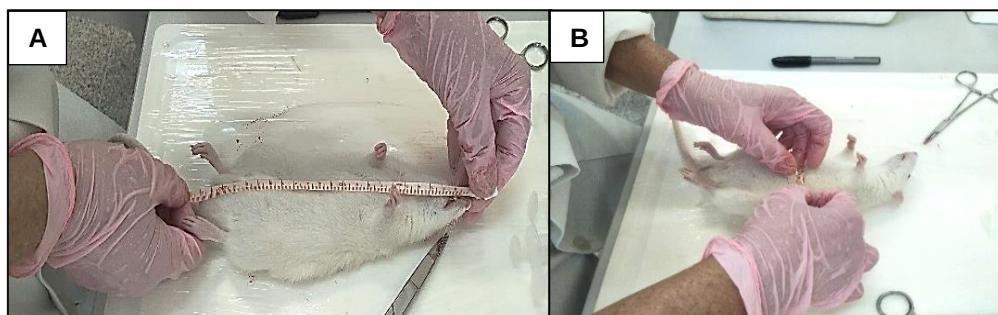
4.4.9. Dados murinométricos

A distância nasoanal e a circunferência abdominal de cada animal foram aferidos com o auxílio de uma fita métrica inelástica (Figura 9). Com os dados obtidos foi possível calcular o Índice de Massa Corporal (IMC) para ratos e Índice de Lee. Sendo:

$$\text{IMC} = \text{peso corporal (g)} / \text{comprimento nasoanal (cm}^2\text{)}$$

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso corporal}}}{\text{comprimento nasoanal (cm)}}$$

Figura 9. Murinometria.



(A): Aferição comprimento nasoanal. (B): Aferição circunferência abdominal.

Resultados do Índice de Lee acima de 0,3 é indicativo de obesidade e a faixa de normalidade do IMC para ratos é entre 0,45–0,68 g/cm (BERNARDIS, 1970; YUSTISIA et al., 2022).

As medições finais foram realizadas no último dia do experimento logo após os animais serem anestesiados.

4.5. Eutanásia

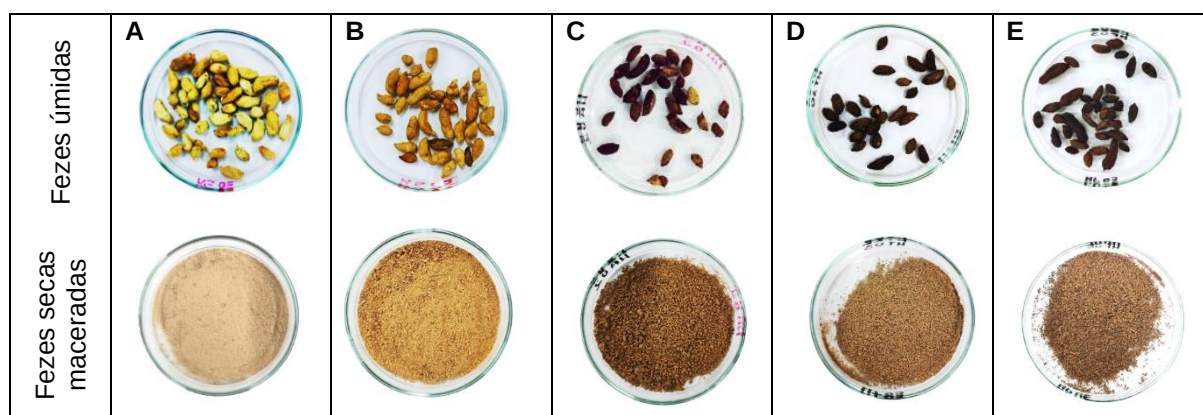
No último dia de experimento (dia 56 – Fase 2), após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal de 0,2 mL/100g peso corporal da solução anestésica contendo 3,75mL de cetamina, 2,5mL de xilasina e 3,75 mL de soro fisiológico, logo após realizada coleta de dados murinométricos. Posteriormente, o sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C para obtenção do soro, e posteriormente foram armazenados sob a temperatura de - 80°C para análises posteriores. Foram coletados e pesados em balança digital (Radwag®, modelo WPT 6C/1) tecido adiposo epididimal, subcutâneo e visceral, e o fígado. Todos os tecidos passaram por lavagem em soro fisiológico para remoção de sujidades, e posteriormente foram pesados. Um fragmento de fígado foi retirado com auxílio de tesoura cirúrgica para extração lipídica e armazenado a - 80°C, outro fragmento foi imerso em formaldeído a 10% para análise histológica. Os tecidos restantes também seguiram para armazenamento a - 80°C. Para as análises de AGCC e pH foram coletados conteúdo cecal em microtubos devidamente identificados e mantidos - 80°C.

4.6. Análises conteúdo fecal e cecal

4.6.1. Secagem das fezes

Fezes coletadas de três dias foram limpas e mantidas acondicionadas em tubos Falcon identificados para cada animal sob temperatura de -80°C (Thermo Scientific®, modelo REVCO EFX), logo após foram secas e maceradas (Figura 10). A secagem seguiu os procedimentos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2019), em estufa a 105°C (Biopar®, modelo 580SD) até obtenção do peso constante. Logo após, cada amostra foi macerada com auxílio de um pistilo e almofariz, e mantidas nos tubos Falcon identificados e guardados em embalagens laminadas a - 20°C (Electrolux®, Modelo FE 26 vertical).

Figura 10. Fezes dos grupos de tratamento.



(A) NS: normocalórica + FeSO. (B) HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. (C) HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. (D) HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. (E) HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú.

4.6.1.1. Extração fecal de lipídios

Os lipídios fecais foram extraídos segundo o método de Folch; Lees; Stanley (1957) com adaptações. Primeiramente 100 mg das fezes secas foram pesados e colocados em tubos de ensaio, logo após foram adicionados 1,9 mL de solução clorofórmio: metanol (2:1) e homogeneizadas em vórtex por 3 minutos. Em seguida foram adicionados 400 µL de metanol e então, centrifugadas por 10 minutos, a 3000 rpm. Os sobrenadantes das misturas foram retirados com pipetas de Pasteur e transferidos para tubos de ensaio previamente tarados. Seguidamente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio e 640 µL de NaCl (0,73%), e uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente, e a fase superior foi desprezada. Com o auxílio de uma pipeta, as paredes internas dos tubos de ensaio foram lavadas com 900 µL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 29%) de modo que o fluido de lavagem caísse levemente nas paredes do tubo de ensaio para que não misturasse as duas fases. Após a lavagem a fase superior foi descartada. Por último os extratos lipídicos foram secos em estufa (Biopar®, modelo 580SD) semiaberta a 37°C por até peso constante por 24 horas. Após secos, os tubos foram acondicionados no dessecador para posterior pesagem em balança analítica (SHIMADZU®, modelo AUY220). O teor total de lipídios foi determinado pela diferença gravimétrica do peso dos tubos de ensaio na presença e ausência dos extratos lipídicos.

$$\% \text{ Lipídios} = \text{massa de} \frac{\text{lipídios (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100$$

Os lipídios extraídos foram ressuspensos em 500 µL de álcool isopropílico e armazenados em microtubos identificados a -80 °C sob ausência da luz.

A partir do peso exato das fezes e massa lipídica extraída na metodologia Folch, foram calculados a excreção diária de triglicérides e colesterol fecal. Sendo:

$$\text{CT ou TG (3 dias)} = \text{CT ou TG (mg/dL)} * \text{fezes secas 3 dias (mg)} / \text{fezes usadas no Folch (mg)}$$

$$\text{CT OU TG diário} = \text{CT ou TG (3 dias)} / 3$$

No qual: CT, colesterol total e TG, triglicérides.

O balanço lipídico diário foi através da diferença entre lipídio ingerido e o excretado nas fezes.

A extração lipídica hepática seguiu a mesma metodologia Folch utilizada para extração fecal. Para determinação de colesterol total e triglicérides a nível fecal e hepático foram utilizados kit comerciais da marca Labtest® (Colesterol Liquiform Ref.: 76 e Triglicérides Liquiform Ref.: 87), acompanhando os protocolos do fabricante.

4.6.2. pH do conteúdo cecal

Uma alíquota do conteúdo cecal armazenado a -80°C de cada animal foi pesado e diluído na proporção de 1:10 com água deionizada em tubos Falcon de 15mL, homogeneizadas em agitador de tubos (MARCONI®, MA162), e em seguida realizada a leitura no pHmetro (Kasvi®, modelo K39) até estabilização do pH (GRANCIERI et al., 2017; VEREDIANO et al., 2022).

4.6.3. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) do conteúdo cecal

Os ácidos orgânicos acetato, butirato e propionato foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). No qual 100 mg de conteúdo cecal foram suspensas em 300 µL de água ultrapura e posteriormente centrifugadas a

(10000 x g, 10 min). O sobrenadante foi processado conforme descrito por Siegfried et al. (1984). As amostras foram separadas em coluna Biohad® HPX 87H, 300 x 7,8 mm mantida a 45°C utilizando cromatógrafo Shimadzu Prominence 20^a®, acoplado a um detector de índice de refração (RID) Shimadzu 20A®. Para a fase móvel utilizou-se ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5,0 mM com fluxo de 0,7 mL/min, e o ácido crotônico como padrão interno nas amostras e curva de calibração.

4.7. Biomarcadores hematológicos

Para determinar o teor de hemoglobina, 20 µL de sangue foram homogeneizados em 5 mL do reagente de cor, preparado segundo as instruções do kit comercial (Labtest®, Hemoglobina Ref.: 43 e Padrão de Hemoglobina Ref.: 47). Uma alíquota de 200 µL desta mistura foi pipetada em microplaca de 96 poços e foi determinada a absorbância em 540 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, marca Thermo Scientific). O resultado final (g/dL) foi obtido a partir da divisão da absorbância encontrada na amostra teste sobre a absorbância encontrada no produto padrão de hemoglobina, multiplicado por 10 (valor de Hb do padrão).

O ganho de hemoglobina foi calculado pela diferença na concentração de hemoglobina, entre os dias 21 da depleção (Hb inicial) , após 14 (Fase 1) e 35 (Fase 2) dias após a repleção.

$$\text{Ganho de Hb (g/dL)} = \text{teor de Hb final (g/dL)} - \text{teor de Hb inicial (g/dL)}$$

O *pool* de ferro na hemoglobina foi calculado assumindo o total volume de sangue como sendo de 6,7% do peso corporal do rato conforme Cartland e Koch (1928) e o teor médio de ferro na Hb de 0,335% seguindo as fórmulas abaixo (THANNOUN et al., 1987):

$$\text{Hb-Fe inicial (mg)} = \frac{[\text{peso inicial (g)} \times \text{teor de Hb inicial (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335]}{1000}$$

$$\text{Hb-Fe final (mg)} = \frac{[\text{peso final (g)} \times \text{teor de Hb final (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335]}{1000}$$

A Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE- *Hemoglobin*

Regeneration Efficiency) e o Valor Biológico Relativo (RBV) foram determinados pelas equações abaixo (MAHONEY; VANORDEN; HENDRICKS, 1974):

$$\text{HRE (\%)} = \frac{\text{Hb-Fe final (mg)} - \text{Hb-Fe inicial (mg)}}{\text{Ferro consumido (mg)}} \times 100$$

$$\text{RBV} = \frac{\text{HRE do grupo teste (\%)}}{\text{HRE do grupo controle (\%)}} \times 100$$

Para o cálculo do RBV foi fixado o grupo controle positivo HS (rica em gordura e açúcar + FeSO₄).

4.8. Análise dos reguladores do metabolismo ferro

A análise do Fe sérico seguiu metodologia adaptada de Pelizaro et al. (2007) com diluição em água deionizada na proporção 1:1. A leitura da concentração de Fe sérico foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SavantAA; GBC Scientific Equipment®), com o auxílio de um amostrador automático (GBC SDS-270®). Para a curva padrão utilizou-se o padrão multi-elementar (Sigma®) a 5ppm. O resultado final foi expresso em µg/dL.

As análises das proteínas, ferritina e transferrina, foram realizados a partir do soro em um laboratório de análises clínicas localizado na cidade de Alegre, sul do Espírito Santo, com uso de kits comerciais (Ref.: K081 e Ref.: Ref.: 114, marca Bioclin®) através da metodologia de imunoturbidimetria.

4.9. Análise bioquímica e teste de tolerância a glicose (GTT)

4.9.1. Perfil lipídico e enzimas hepáticas

Foram utilizados kits comerciais da marca Analisa® (Ref.: 460, HDL Direto Ref.: 400, Ref.: 459) para análise do colesterol total (CT), HDL (*High Density Lipoprotein*) e triglicérides (TG) do soro seguindo os protocolos do fabricante.

Para quantificar o LDL-c (*Low-density Lipoproteins*) foi utilizado a equação de Friedewald, a qual estima o nível de LDL-c através das concentrações de colesterol total, HDL-colesterol e da concentração de triglicerídeos (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

$$C_{LDL} \text{ mg/dL} = C_{total} - C_{HDL} - (TG/5)$$

Onde na fórmula: C_{LDL} : colesterol LDL; C_{total} : colesterol total; C_{HDL} : colesterol HDL e TG: triglicerídeos.

A partir dos resultados foram calculadas as razões LDLc-/HDL-c e CT/HDL-c.

Para analisar a função hepática através das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) do soro foram utilizados kits comerciais (Transaminase ALT (TGP) cinética, Ref.: K049 e Transaminase AST (TGO) cinética, Ref.: K048, marca Bioclin®), seguindo os protocolos do fabricante.

4.9.2. Perfil glicídico

4.9.2.1. Glicemia de jejum e análise insulínica

A análise da glicemia de jejum foi realizada a partir do soro com o kit comercial marca Analisa®, Ref.: 112. A análise da insulina foi realizada a partir soro com kit ELISA comercial Elabscience® Rat INS (Insulin) (E-EL-R2466), seguindo as orientações do fabricante.

A partir dos resultados de triglicérides, HDL-c, glicemia, e insulina de jejum foram calculados razão TG/HDL-c, HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*) e índice QUICKI (*Quantitative Insulin sensitivity Check Index*) (KATZ et al., 2000; MATTHEWS et al., 1985).

O índice HOMA-IR foi calculado a partir da fórmula abaixo:

$$HOMA - IR = \text{insulina de jejum} \left(\frac{mU}{L} \right) \times \text{glicose de jejum} \left(\frac{mg}{dL} \right) / 405$$

Para cálculo do QUICKI a seguinte fórmula:

$$QUICKI = \frac{1}{\log \text{insulina de jejum} \left(\frac{\mu U}{mL} \right) + \log \text{glicemia de jejum} \left(\frac{mg}{dL} \right)}$$

O índice triglicerídeo-glicose (TyG) foi realizado a partir da fórmula:

$$\ln [\text{triglicérides de jejum} (mg/dL) \times \text{glicemia de jejum} (mg/dL) / 2]$$

4.9.2.2. Teste de tolerância à glicose via intraperitoneal

No penúltimo dia do experimento, dia 55, após 12 horas de jejum, uma solução de glicose 50% (2g/kg de peso corporal) foi administrada via cavidade intraperitoneal dos animais. A análise da concentração da glicose se deu através do sangue obtido a

partir de uma incisão na parte terminal da cauda no tempo zero (início), e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. A glicemia foi quantificada por meio de um glicosímetro (*Accu-check, Active®*) com uma tira de teste apropriada. A área incremental sob a curva de glicose sanguínea (iAUC) foi calculada usando programa estatístico GraphPad Prism, versão 9.0.

4.11. Histologia hepática

Após as amostras de fígados serem fixadas em formaldeído a 10%, seis foram escolhidas aleatoriamente para passarem por macrotomia com cortes de 4 mm e seguiram para o processo de desidratação e clarificação em histotécnico (OMA®, DM-40). Em seguida, foram embebidas em parafina, e então realizados cortes histológicos de 4 µm de espessura e corados com a técnica de coloração H&E (hematoxilina e eosina).

A análise hepatocelular se baseou na metodologia de Liang et al. (2014), utilizando-se de um escore (Tabela 3). Resumidamente, as lâminas coradas com H&E foram avaliadas em microscópio (L2000-B-PL) com objetiva de 40x, observando-se a presença de esteatose macrovesicular e microvesicular, megalocitose, fibrose e inflamação. A esteatose macrovesicular e microvesicular foram avaliadas separadamente de acordo com a porcentagem de área total afetada, e conforme o deslocamento do núcleo para o lado (macrovesicular) ou não (microvesicular). A megalocitose foi considerada quando houve aumento anormal das células superior a 1,5 vezes o diâmetro normal dos hepatócitos. A inflamação foi avaliada considerando a quantidade de focos inflamatórios, sendo o foco definido como aglomerado com ≥ 5 células.

Tabela 3. Sistema de classificação para esteatose.

Características histológicas		Escore			
		0	1	2	3
		Normal	Pouco	Moderado	Forte
Esteatose:	Macrovesicular	< 5%	5 - 33 %	33 – 66 %	> 66 %
	Microvesicular	< 5%	5 - 33 %	33 – 66 %	> 66 %
	Megalocitose	< 5%	5 - 33 %	33 – 66 %	> 66 %
Inflamação:	Número de focos inflamatórios	< 0.5	0.5 – 1.0	1.0 – 2.0	> 2.0

Fonte: Adaptado de Liang et al. (2014).

Essa avaliação hepatocelular foi realizada às cegas por uma pesquisadora patologista externa ao projeto, no laboratório de Patologia do hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado em Rive, campus de Alegre, na região sul do Espírito Santo.

A fotomicroscopia de cada tratamento foi realizada em microscópio óptico (OPTICAM®, O500R) com objetiva de 20x, e a de 60x para demonstrar a presença de macro e microvesículas.

4.12. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.0. Para os resultados dos 5 tratamentos no estudo animal foi usado teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov. Confirmada a normalidade dos dados, foi realizado o teste *t* não pareado para comparar os tratamentos controles, NS (normocalórica + FeSO) e HS (rica em gordura e açúcar + FeSO₄). A análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, foi aplicado para os tratamentos com dieta rica em gordura e açúcar e para a composição química dos feijões. Para análises de correlação utilizou-se Pearson. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises físico-químicas dos feijões-caupi

Os resultados referentes a composição centesimal, valor energético total, amido e fatores complexantes dos feijões-caupi biofortificados e convencional em base seca estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Composição centesimal, VET, amido resistente, fatores complexantes e ferro dos feijões-caupi.

	Biofortificados		Convencional
	BRS Aracê	BRS Tumucumaque	BRS Pajeú
Umidade (g/100g)	1,64 ± 0,04 ^c	1,89 ± 0,12 ^b	2,46 ± 0,04 ^a
Cinza (g/100g)	4,17 ± 0,03 ^a	3,86 ± 0,17 ^a	3,86 ± 0,26 ^a
Lipídio (g/100g)	2,76 ± 0,10 ^a	2,80 ± 0,14 ^a	2,70 ± 0,02 ^a
Proteína (g/100g)	27,92 ± 0,66 ^a	26,07 ± 0,40 ^b	24,42 ± 0,29 ^c
Carboidratos digeríveis (g/100g)	42,15	40,71	43,33
Fibra Alimentar Total (g/100g)	21,37 ± 2,47 ^a	24,68 ± 2,38 ^a	23,23 ± 2,54 ^a
Fibra Alimentar insolúvel (g/100g)	19,91 ± 1,27 ^a	22,65 ± 1,91 ^a	17,41 ± 2,43 ^a
Fibra Alimentar Solúvel (g/100g)	1,47 ± 1,20 ^b	2,03 ± 0,47 ^b	5,82 ± 0,11 ^a
VET (kcal)	305,12	292,28	295,30
Amido resistente (g/100g)	2,52 ± 0,26 ^c	3,26 ± 0,25 ^b	3,85 ± 0,37 ^a
Fitato (g/100g)	1,01 ± 0,13 ^a	1,03 ± 0,03 ^a	1,03 ± 0,05 ^a
Taninos (mgEC / g)	n.d.	n.d.	n.d.
Razão molar Fi:Fe	12,48	12,90	17,97
Ferro (mg/kg)	68,21 ± 4,55 ^a	67,17 ± 2,52 ^a	48,61 ± 4,61 ^b

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. VET: Valor Energético Total. Kcal: quilocaloria ingerida. Fe: Ferro. EC: Equivalente a catequina. GAE: Equivalente ao ácido gálico. Fi:Fe: fitato:ferro. N.d.: Não detectado.

Em relação aos dados da composição centesimal há semelhança de dados para cinza, lipídio, fibra alimentar total e a insolúvel, e para fitato.

Em termos de teor proteico o feijão-caupi biofortificado Aracê obteve maior valor, alinhando-se com outros dados da literatura em estudo com o mesmo cultivar (SILVA, 2022).

O complexante fitato não apresentou diferença significativa e se manteve dentro dos valores indicados na literatura, variando de 0,6% a 2,7% em feijões (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; MILLER, 2019). O teor de taninos não foi detectado nos cultivares estudados, o que corrobora alguns estudos realizados com feijão-caupi (SANT'ANA et al., 2019; SILVA, 2022).

A razão molar $Fi:Fe$, pode predizer a biodisponibilidade do Fe nos alimentos (RAHMAN; SHAHEEN, 2022). Então, subentende-se que o Aracê e Tumucumaque, por apresentar menor razão $Fi:Fe$ tenha maior biodisponibilidade do mineral Fe.

Verifica-se que conforme esperado, os teores de Fe foram superiores nos cultivares biofortificadas, apresentando teores superiores ao convencional. O feijão-caupi Aracê apresentou um teor de Fe 40,32% superior a cultivar convencional, enquanto o Tumucumaque apresentou um aumento de 38,18% em comparação ao Pajeú. O Pajeú, por não ser biofortificado, apresenta teor de Fe semelhante aos feijões comuns normalmente consumidos.

Nossos resultados permeiam informações científicas da literatura. A baixa umidade dos feijões-caupi, inferior a 3%, demonstra a eficácia da liofilização, um processo de secagem por sublimação que visa garantir a estabilidade do produto durante o armazenamento. Esse método é considerado eficiente, pois preserva as características nutricionais do alimento (ARAÚJO et al., 2022). Em contraste, o uso de estufas com circulação de ar pode resultar em teores de umidade superiores a 3%, chegando a até 7,54 g/100g (ANTUNES et al., 2019; SANT'ANA et al., 2019). É importante ressaltar que a umidade, as fibras alimentares e o amido resistente estão interligados. O aumento no teor de água pode levar ao incremento das frações de fibras alimentares e amilopectina, o que poderia estar relacionado aos maiores resultados obtidos com a variedade Pajeú para amido e fibra solúvel. As estruturas de amido podem ser influenciadas pelo teor de água, o que afeta a taxa e a extensão da retrogradação (ALMEIDA; FÁVARO; GALVANI, 2012; KAUR et al., 2023; YANG et al., 2021).

Em relação ao teor proteico do feijão-caupi, há evidências de variação entre 23,6% e 27,9% em base seca (NURMOMADE et al., 2024). Leguminosas com alto

teor de proteínas pode apresentar alta pontuação de aminoácidos e fornece peptídeos bioativos que podem contribuir para a redução dos riscos de câncer e doenças cardiovasculares, além de exercer uma potente ação contra a oxidação e a inflamação (MATEMU; NAKAMURA; KATAYAMA, 2021). Outros estudos científicos ressaltam o potencial da proteína do feijão-caupi na indústria alimentícia. Com boa qualidade nutricional e características tecnofuncionais favoráveis, essa proteína é sustentável, de baixo custo e pode servir como uma alternativa às proteínas animais, podendo ser utilizada na forma de isolados ou hidrolisados (LOUSHIGAM; SHANMUGAM, 2023; MUNE; MINKA, 2017).

Assim como em nosso estudo, Silva (2022) também encontrou maiores valores de amido resistente (7,43 g/100 g) e fibras solúveis (5,85 g/100 g) na variedade Pajeú, em comparação com Xique-xique, Aracê e Tumucumaque. O amido resistente apresenta efeitos semelhantes aos das fibras alimentares solúveis (KHAN et al., 2019). Ambos podem desacelerar a absorção de glicose, reduzir a resistência insulínica e a absorção lipídica. Além disso, no intestino, podem atuar como substratos prebióticos para a microbiota intestinal, promovendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; HUBER; BEMILLER, 2019).

Em nosso estudo não foi evidenciado a presença de taninos, o que pode ser considerada benéfica partindo do princípio que esse complexante pode se combinar com proteínas, polissacarídeos e minerais como o ferro, reduzindo o valor nutricional do alimento. Sugere-se que essa ausência possa contribuir para uma melhor biodisponibilidade de nutrientes e tornar os feijões-caupi ser mais palatáveis, visto que esses compostos contribuem para a adstringência (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; SCHWARTZ et al., 2019).

Gomes et al. (2022), em seu estudo com os cultivares Pajeú e Aracê obtiveram valores de Fi:Fe inferiores ao nosso estudo. Essa razão molar fitato: ferro elevado pode sugerir absorção reduzida de Fe através da mucosa intestinal, o que pode interferir concomitantemente a concentração de hemoglobina (RAHMAN; SHAHEEN, 2022).

Assim, os feijões-caupi biofortificados, alvos dessa pesquisa e do programa de biofortificação da Embrapa atingiram o objetivo, considerando os teores de Fe superiores à média do feijão-caupi convencional. O Aracê além do teor de Fe

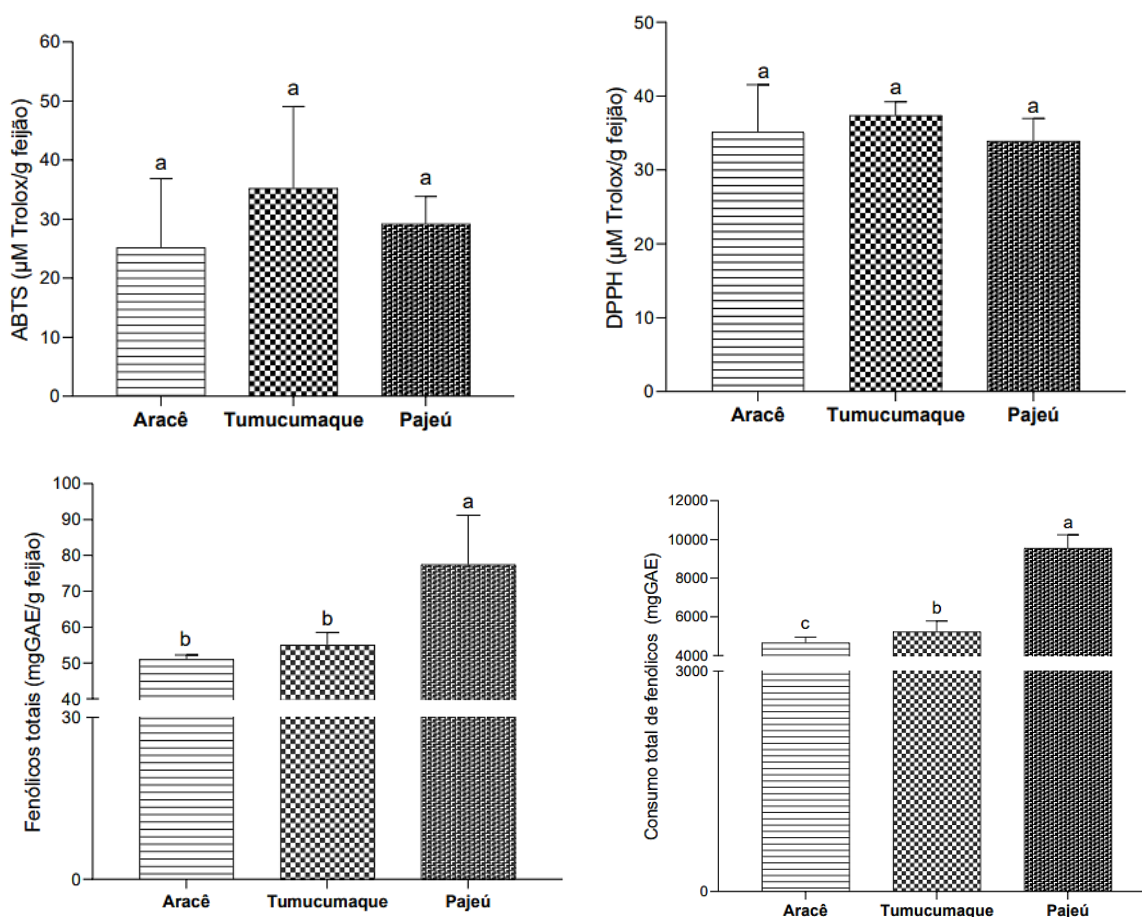
semelhante ao Tumucumaque apresentou menor razão Fi:Fe e maior conteúdo proteico.

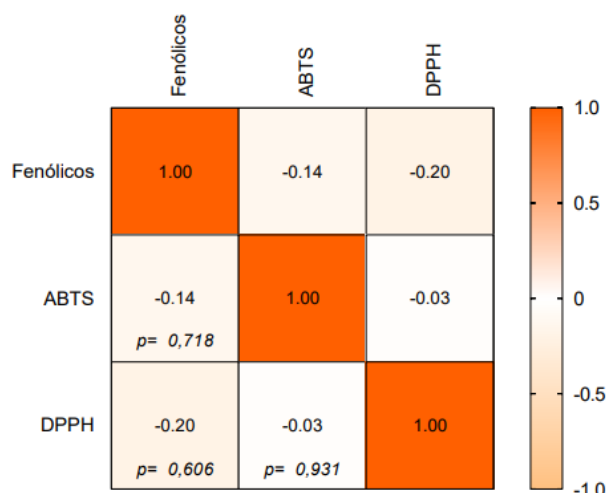
Portanto, as cultivares de feijão-caupi biofortificadas são estratégias proeminentes para melhorar a ingestão de Fe em grupos com deficiência de micronutrientes (COELHO et al., 2021). A boa qualidade nutricional apresentada pode ser estratégica para o melhoramento de culturas através da biofortificação, ajudando a mitigar problemas associados a desnutrição (MBUMA et al., 2022). Porém, em termos de biodisponibilidade, essas concentrações de Fe das culturas biofortificadas não implica necessariamente aumentos proporcionais na sua absorção intestinal devido aos compostos complexantes (DIAS et al., 2018).

5.1.1. Capacidade antioxidante e fenólicos totais dos feijões-caupi

Os resultados obtidos para atividade antioxidante através do método ABTS, DPPH, o conteúdo fenólico total e a matriz de correlação estão dispostos na Figura 11.

Figura 11. Atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais da farinha dos feijões-caupi.





Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. Matriz de correlação: * $p < 0,05$.

A capacidade antioxidante, ABTS e DPPH, do extrato aquoso manteve-se semelhante nas três cultivares.

No entanto, nota-se que a concentração de fenólicos totais nos grãos e ingestão total de fenólicos foi maior no cultivar convencional com sementes coloridas. O Pajeú apresentou 77,44 mgGAE/g de fenólicos totais, ou seja, mais de 40% em relação às outras duas cultivares e a ingestão de fenólicos do grupo consequentemente foi maior (9556 mgGAE).

Esse resultado para teor de fenólicos e ingestão já era aguardado e faz referência ao que é proposto na literatura. Os compostos fenólicos são uma parte importante do metabolismo das plantas e influenciam diretamente características sensoriais como cor, aroma e sabor (NEMLI et al., 2024). Grãos de tegumento mais escuro tendem a ter valores mais altos (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; MILLER, 2019). Isso está evidenciada na coloração dos grãos do Pajeú, que se apresentam com tegumento mais escuro (Figura 6). Dados da literatura que fizeram uso de diferentes tipos de feijões-caupi com tegumentos colorido obtiveram resultados semelhantes para maior teor de fenólicos (SOMBIÉ et al., 2018; TZANOVA et al., 2023).

O teor de fenólicos em alimentos é um campo que está sendo explorado de forma substancial devido ao seu potencial terapêutico no desenvolvimento de abordagens farmacêuticas que visem reduzir as complicações decorrentes de patologias metabólicas como as DCNT. Podem atuar inibindo da α -amilase, α -glicosidase, ter efeito hipoglicemiantes e anticarcinogênicos, atuar na redução da

inflamação, na preservação das células beta, na redução da glicação proteica, como antioxidante e na produção de AGCC (FARIAS et al., 2021; MYERS et al., 2019). Moreira- Araújo et al. (2018), no estudo com Xiquexique identificou a catequina, epicatequina, ácido gálico, ácido ferúlico e ácido clorogênico como os principais fenólicos. A catequina amenizou o estresse oxidativo em ratos machos Sprague Dawley diabéticos. Segundo os pesquisadores, a administração de 25 e 50 mg kg⁻¹ por 28 dias de catequina melhorou a hemodinâmica basal, reduziu os níveis de malondialdeído, metaloproteinase de matriz 9 e lesões neuropáticas, além de aumentar os níveis de glutathione, superóxido dismutase e catalase Addepalli; Suryavanshi, 2018). O uso de 30 e 60 mg kg⁻¹ de polifenóis de *Synsepalum dulcificum* por 21 dias ratos Wistar machos estimularam a secreção de insulina, inibição da α -amilase e a α -glicosidase e níveis reduzidos de marcadores inflamatórios, TGF- α e IL-6 (OBAFEMI; OLALEYE; AKINMOLADUN, 2019).

Nota-se que o cultivar que apresentou maior teor proteico, Aracê com 27,92 g/100g (Tabela 4), é o mesmo que obteve menor teor de fenólicos totais, 51,01 mgGAE/g (Figura 11). Tzanova et al. (2023), ao comparar 15 genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., notou que os genótipos de feijão-caupi com tegumento de cor escuram apresentaram maiores potenciais antioxidantes, mas menores teores de proteínas.

A correlação significativa entre conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante é apontado por pesquisadores, sugerindo o envolvimento dos fenólicos nas atividades antioxidantes (PRASADI et al., 2023; SOMBIÉ et al., 2018; TZANOVA et al., 2023). Em nosso estudo, a análise da correlação de Pearson entre fenólicos e capacidade antioxidante não identificou correlações significativas (Figura 11). Sombié et al. (2018), analisou 31 variedades de feijões-caupi, descobriu que o potencial de eliminação de óxido nítrico não está relacionado ao seu conteúdo total de fenólico, o que pode estar atrelado ao presente estudo.

Segundo Zhao et al. (2014), a capacidade antioxidante das leguminosas pode ser influenciada pelos polissacarídeos ativos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e microelementos; fatores ambientais e o solvente utilizado para a extração. A variabilidade nos perfis fitoquímicos dentro da mesma espécie, composição individual dos fitoquímicos antioxidantes e a interação que pode ocorrer entre as substâncias da matriz alimentar com os analitos envolvidos no desenvolvimento dos ensaios para

avaliação antioxidante também podem contribuir (BOROSKI et al., 2015; TUNGMUNNITHUM et al., 2021).

Apesar a possibilidade de reduzir a biodisponibilidade de Fe, nossos resultados podem ser significativos na escolha de materiais para melhoramento genético e na escolha de alimentos com possíveis propriedades funcionais. Dada a importância dos compostos fenólicos para a saúde, sugerimos que o cultivar Pajeú apresenta potencial para atenuar complicações metabólicas associadas a dietas ricas em gordura e açúcar, devido ao seu conteúdo fenólico. Em estudos futuros, aconselha-se considerar a análise do perfil fenólico deste cultivar.

5.4. Análises do estudo *in vivo*

5.4.1. Efeitos das dietas sobre ganho de peso e consumo alimentar

5.4.1.1. Fase da depleção

Na Tabela 5 estão os resultados referentes ao consumo alimentar, ganho de peso e coeficiente de consumo alimentar da fase de depleção com duração de 21 dias.

Tabela 5. Análise do consumo alimentar e ganho de peso na fase da depleção.

Indicadores	NS	HS	HA	HT	HP
Consumo	394,90 ±	293,20 ±	286,20 ±	325,90 ±	285,80 ±
alimentar (g)	39,05 *	50,64 ^a	42,92 ^a	27,27 ^a	31,82 ^a
Ganho de	109,50 ±	105,20 ±	105,50 ±	105,20 ±	101,60 ±
peso (g)	17,23	20,01 ^a	13,91 ^a	17,73 ^a	15,63 ^a
CEA	27,74 ± 3,46 *	35,42 ± 3,80 ^a	37,09 ± 3,31 ^a	33,19 ± 4,49 ^a	35,65 ± 4,49 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma linha. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. CEA: Coeficiente de eficiência alimentar.

Verificou-se que os grupos alimentados entre as dietas rica em gordura e açúcar se assemelharam entre si.

O menor consumo do grupo HS pode estar relacionado a maior de densidade energética e saciedade ocasionada pelo alto teor de gordura na dieta (MCCLEMENTS; DECKER, 2019).

5.4.1.2. Fase da repleção

Os efeitos dos feijões-caupi sobre consumo alimentar e ganho de peso nas fases 1 e 2 da repleção estão apresentados na Tabela 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Fase 1: análise do consumo alimentar e ganho de peso na fase da repleção (14 dias).

Fase 1 Repleção ¹	NS	HS	HA	HT	HP
Consumo alimentar (g)	241,90 ± 2,11 *	216,60 ± 13,72 ^a	201,20 ± 28,00 ^a	214,70 ± 22,78 ^a	205,90 ± 23,67 ^a
Ganho de peso (g)	22,43 ± 5,17 *	45,75 ± 11,70 ^a	57,98 ± 13,34 ^a	49,22 ± 12,95 ^a	57,27 ± 17,86 ^a
CEA	9,62 ± 1,93 *	21,40 ± 5,68 ^a	27,80 ± 5,16 ^a	23,00 ± 5,92 ^a	27,59 ± 7,59 ^a
CEE	2,50 ± 0,57 *	4,11 ± 0,78 ^b	5,67 ± 1,05 ^a	4,45 ± 0,90 ^{ab}	5,64 ± 1,55 ^a
Consumo de ferro (mg)	5,13 ± 0,04 *	3,64 ± 0,23 ^a	3,67 ± 0,51 ^a	3,80 ± 0,40 ^a	3,62 ± 0,42 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. ¹ 14 dias após repleção. NS: normocalórica + FeSO. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. CEA: coeficiente de consumo alimentar. CEE: coeficiente de eficiência energética.

Tabela 7. Fase 2: análise do consumo alimentar e ganho de peso na fase da repleção (35 dias).

Fase 2 da Repleção ¹	NS	HS	HA	HT	HP
Consumo alimentar (g)	608,80 ± 19,67 *	523,51 ± 35,81 ^a	504,83 ± 58,09 ^a	531,55 ± 57,17 ^a	499,83 ± 35,87 ^a
Ganho de peso (g)	70,44 ± 9,58 *	90,02 ± 16,43 ^b	110,30 ± 24,71 ^{ab}	110,80 ± 29,24 ^{ab}	122,30 ± 23,78 ^a
CEA	11,56 ± 1,47 *	17,35 ± 3,04 ^b	21,97 ± 3,38 ^{ab}	20,85 ± 4,57 ^{ab}	24,25 ± 4,16 ^a
CEE	3,10 ± 0,39	3,56 ± 0,62 ^b	4,48 ± 0,69 ^a	4,40 ± 0,85 ^{ab}	4,96 ± 0,85 ^a
Consumo de ferro (mg)	12,91 ± 0,42 *	8,80 ± 0,60 ^a	9,22 ± 1,06 ^a	9,39 ± 1,01 ^a	8,79 ± 0,63 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. ¹ 35 dias após a repleção. NS: normocalórica + FeSO. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. CEA: coeficiente de consumo alimentar. CEE: coeficiente de eficiência energética.

O NS apresentou diferenças significativas em todas as variáveis para as duas fases, com exceção do CEE da Fase 2. O ganho de peso decorrente da dieta rica em gordura e açúcar e com maior densidade calórica do HS foi superior em 27,80% ao NS (Fase 2).

Na Fase 1 e 2 o grupo HA e HP apresentaram resultados superiores ao HS para CEE. As culturas biofortificadas se mantiveram semelhantes ao controle positivo para CEA durante a repleção (Fase 1 e 2), mas o HP obteve o maior ganho de peso (122,30 ± 23,78g) e CEA (24,25 ± 4,16) em comparação ao HS (Fase 2).

No grupo NS, foi utilizada celulose microcristalina, que é purificada e altamente insolúvel. Isso pode resultar em menor saciedade, levando a um maior consumo de dieta (FILISETTI; LOBO; COLLI, 2020; HUBER; BEMILLER, 2019). A menor ingestão do HS em relação ao NS pode ser conferida a maior densidade energética e à maior saciedade proporcionada pela dieta rica em gordura e açúcar do tratamento HS, pois o sabor, textura e aparência da dieta pode ser influenciada pelo tipo e concentração de lipídios (LI et al., 2022a; MCCLEMENTS; DECKER, 2019).

A semelhança entre os consumos alimentar, porém, maior ganho de peso do HP (Fase 2), subentende-se que a ingestão excedeu o gasto energético, mesmo que o feijão-caupi tenha apresentado maior teor de fibra solúvel (AN; CHO; YOON, 2023). O tecido adiposo é a principal via de armazenamento de calorias, em especial depósitos subcutâneos ou viscerais, e quando em excesso, triglicérides podem ser sintetizados a partir de ácidos graxos livres (AN; CHO; YOON, 2023).

A redução do peso, é preconizado para mitigar riscos à saúde devido as complicações oriundas do excesso de peso. Além das frações de fibras alimentares solúveis, há a presença de fenólicos, que são geralmente reconhecidos por dar um sabor adstringente nos alimentos (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; HORST; CRUZ; LAJOLO, 2020). Entretanto, esses fatores não impactaram expressivamente o na redução do consumo e peso corporal do HP.

Trabalhos anteriores mostraram que a ingestão de dietas hipercolesterolêmicas adicionadas de proteína de feijão-caupi não alterou o peso corporal e o consumo de alimentos de ratos (machos e fêmeas). Os autores sugeriram a relação com as diferenças fisiológicas (hormônios), requisitos nutricionais e modo de consumo de alimentos (ALASHI; WU; ALUKO, 2021). A incorporação de 4 tipos de feijão-caupi em dietas experimentais com ratos Wistar também não ocasionou diferença no peso dos animais após 6 semanas (PERERA et al., 2016).

Entretanto, os maiores valores de eficiência alimentar do HP (Fase 2) e energética do HA e HP (Fase 1 e 2) em comparação ao HS, propõe que a suplementação com o feijão-caupi biofortificado Aracê e o convencional Pajeú ao longo de cinco semanas em uma dieta rica em gordura e açúcar obtiveram uma melhor eficiência na utilização de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento dos ratos Wistar.

5.4.2. Medidas murinométricas e tecidos adiposos

Os dados murinométricos e informações sobre os tecidos adiposos constam logo abaixo, na Tabela 8.

Tabela 8. Indicadores murinométricos e peso dos tecidos adiposos.

Indicadores	NS	HS	HA	HT	HP
CC (cm)	15,50 ± 1,04	15,61 ± 0,98 ^a	16,33 ± 0,65 ^a	16,25 ± 1,39 ^a	15,46 ± 1,22 ^a
CNA (cm)	23,17 ± 0,89	22,82 ± 1,08 ^a	23,46 ± 1,10 ^a	23,38 ± 1,33 ^a	23,13 ± 1,45 ^a
TAT(g)	11,80 ± 3,60	13,92 ± 4,54 ^b	19,61 ± 4,41 ^a	18,39 ± 5,08 ^{ab}	17,49 ± 4,69 ^{ab}
TAE (g)	5,20 ± 1,43	5,82 ± 1,89 ^a	7,37 ± 1,65 ^a	7,17 ± 2,32 ^a	6,25 ± 1,91 ^a
TAS (g)	4,17 ± 1,19	4,96 ± 1,79 ^b	7,49 ± 2,40 ^a	7,37 ± 2,19 ^{ab}	6,64 ± 1,98 ^{ab}
TAV (g)	3,24 ± 1,40	2,58 ± 1,07 ^b	4,17 ± 1,27 ^a	4,09 ± 1,29 ^{ab}	4,11 ± 1,56 ^a
IMC (g/cm ²)	0,57 ± 0,03	0,60 ± 0,09 ^a	0,61 ± 0,06 ^a	0,63 ± 0,08 ^a	0,62 ± 0,05 ^a
Índice de Lee	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,00 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma linha. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA seguido do teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. CC: circunferência da cintura. CNA: comprimento nasoanal. TAT: tecido adiposo total. TAE: tecido adiposo epididimal. TAS: tecido adiposo subcutâneo. TAV: tecido adiposo visceral. TAT: tecido adiposo total. IMC: Índice de Massa Corporal.

Os preditores de excesso de peso (Lee e IMC) não indicaram obesidade após 8 semanas com dieta rica em gordura e açúcar. Além disso, o grupo HA teve maior quantidade tecido adiposo visceral, subcutâneo e total quando comparado ao grupo HS.

Os resultados pressupõem que, entre as formas de armazenamento de energia, ela foi estocada principalmente na forma de gordura corporal, considerando que o tecido adiposo é a principal via de armazenamento de calorias, em especial depósitos subcutâneos ou viscerais, e quando em excesso, triglicérides podem ser sintetizados a partir de ácidos graxos livres (AN; CHO; YOON, 2023).

Embora o IMC possa ser utilizado para avaliar a gordura corporal em ratos e prever as consequências associadas à obesidade segundo menciona Novelli et al. (2007), o tempo de intervenção deste estudo com uma dieta obesogênica não se mostrou eficaz para induzir um quadro de obesidade nos animais.

A maior quantidade tecido adiposo visceral pode ter repercussões negativas para a saúde. Implica no aumento de risco de distúrbios glicêmicos e insulinêmicos,

que são fatores de risco cardiovascular. Adicionalmente, apresenta maior sensibilidade à lipólise, além de secretar quantidades elevadas de citocinas inflamatórias (CARVALHO; DUTRA, 2014; COSTA et al., 2016). Em relação à saúde hepática, a gordura visceral possui uma correlação mais forte do que a gordura subcutânea para a gênese da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) e as doenças hepáticas associadas à disfunção metabólica (MAFLD), bem como à síndrome metabólica (DING et al., 2023; HERNÁNDEZ-CONDE et al., 2020).

5.4.3. Análise conteúdo fecal e cecal

5.4.3.1. Efeitos dos feijões-caupi na excreção lipídica fecal

Os resultados para as análises do conteúdo fecal estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 9. Ingestão e excreção lipídica diária dos ratos Wistar.

	NS	HS	HA	HT	HP
Ingestão lipídica (mg)	1271,00 ± 157,10 *	3956,00 ± 570,90 ^a	4082,00 ± 604,10 ^a	4488,00 ± 685,80 ^a	4401,00 ± 533,60 ^a
Balanço lipídico (mg)	1236,00 ± 157,40 *	3739,00 ± 411,80 ^a	4107,00 ± 458,90 ^a	4422,00 ± 556,70 ^a	4313,00 ± 507,50 ^a
Excreção lipídica (%)	2,95 ± 0,34 *	11,95 ± 6,35 ^a	12,43 ± 5,92 ^a	7,61 ± 1,88 ^a	8,01 ± 2,50 ^a
CT (mg)	1089,00 ± 188,90	1224,00 ± 543,30 ^a	880,70 ± 250,70 ^{ab}	815,70 ± 222,60 ^{ab}	712,50 ± 257,20 ^b
TG (mg)	1137,00 ± 312,00	1018,00 ± 257,10 ^a	731,70 ± 123,70 ^b	692,00 ± 87,64 ^b	723,90 ± 168,30 ^b
Umidade (%)	16,58 ± 3,70	18,17 ± 4,72 ^a	21,99 ± 5,69 ^a	22,27 ± 5,03 ^a	23,08 ± 6,17 ^a
Peso fecal (mg)	1152,00 ± 138,00 *	967,80 ± 243,10 ^a	735,40 ± 141,60 ^b	723,20 ± 113,20 ^b	814,20 ± 257,50 ^{ab}

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. (A) Ingestão e balanço lipídico diário (balanço diário = lipídio ingerido – lipídio excretado). NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. CT: colesterol total. TG: triglicérides.

Aponta-se que o menor teor de gordura do grupo NS alinha-se com a menor ingestão lipídica e excreção.

O HA e HT tiveram maior peso fecal, e o HP menor colesterol total excretado nas fezes. Todos os feijões -caupi apresentaram resultados inferiores ao HS para triglicérides fecais.

A literatura enfatiza o efeito das fibras alimentares na excreção lipídica fecal. A fibra alimentar pode se ligar aos ácidos biliares deixando-os indisponíveis para uso ou reabsorção, e essa indisponibilidade a nível intestinal inibe a absorção de lipídios e colesterol. As fibras alimentares solúveis já diluem os ácidos biliares no trato digestório, ocasionando maior eliminação de ácidos biliares, esteróis e lipídios fecais (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016). Nguyen et al. (2019), encontraram maiores concentrações de esteróis fecais neutros nos grupos suplementados com os feijões *Phaseolus vulgaris* L.

No entanto, os resultados da análise da excreção fecal de lipídios e esteróis indicam que o conteúdo de fibra alimentar solúvel dos feijões-caupi não exerceu uma influência significativa nos ratos Wistar. Isso é concomitante ao fato dos animais alimentados com feijões-caupi não terem tido redução no peso e na gordura corporal, corroborando que os lipídios foram processados e armazenados no organismo. Apontamos para a necessidade de mais investigações sobre o efeito da fibra alimentar do feijão-caupi na excreção lipídica.

5.4.3.2. Implicações do feijão-caupi na produção de ácidos graxos de cadeia curta

A produção de AGCC (acetato, propionato e butirato) e pH cecal é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Produção de acetato, butirato, propionato e avaliação do pH cecal.

	NS	HS	HA	HT	HP
Acetato (mM)	15,77 ± 4,19	12,63 ± 2,04 ^b	19,07 ± 3,55 ^a	16,73 ± 2,13 ^{ab}	16,30 ± 3,26 ^{ab}
Butirato (mM)	2,12 ± 0,58 [*]	2,97 ± 0,53 ^b	4,48 ± 0,91 ^a	4,48 ± 0,95 ^a	2,75 ± 1,03 ^b
Propionato (mM)	5,21 ± 2,26	3,47 ± 0,92 ^c	7,09 ± 0,52 ^{ab}	7,37 ± 1,50 ^a	4,97 ± 2,14 ^{bc}
pH	7,30 ± 0,13 [*]	7,02 ± 0,26 ^b	6,98 ± 0,25 ^b	7,14 ± 0,10 ^b	7,45 ± 0,24 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste t não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú.

A suplementação com o feijão-caupi biofortificado Aracê apresentou concentrações significativamente maiores de acetato, butirato e propionato. O grupo HT, juntamente ao HA, teve um aumento expressivo de butirato, o que possivelmente resultou no pH cecal mais ácido. De forma similar ao estudo de Teixeira-Guedes et al. (2020), realizado com feijão-caupi e feijão preto, o ácido orgânico produzido em maior quantidade foi o acetato.

A suplementação com feijões pode ter aumentado a abundância de bactérias produtoras de AGCC e reduzido a presença de filos bacterianos prejudiciais (LI et al., 2022b; OJO et al., 2021). A redução do pH cecal é benéfica ao microbioma intestinal, pois pode promover o crescimento de bactérias benéficas e diminuir a atividade de enzimas envolvidas na carcinogênese do cólon. Além disso, um ambiente mais ácido no lúmen intestinal pode favorecer a produção de ácido propiônico por meio do aumento de lactobacilos (BIELIK; KOLISEK, 2021; JAYATHILAKE et al., 2018).

O pH ácido também desempenha um papel essencial na homeostase do ferro, facilitando a absorção do Fe²⁺, que é a forma mais facilmente absorvida pelo intestino (BIELIK; KOLISEK, 2021). Em contrapartida, a deficiência de ferro no intestino pode selecionar bactérias que produzem metabólitos capazes de suprimir as vias de absorção intestinal de ferro, através da inibição do HIF-2 α (Fator Induzível por Hipóxia 1-alfa). Essa supressão regula negativamente a expressão dos genes DMT1, DcytB e

FPN, ao mesmo tempo que induz a expressão de ferritina (DAS et al., 2020). Ma; Yeom e Li (2022), relataram que o estado de hipóxia, causado pela produção de propionato, pode aumentar os níveis de HIF-2 α . Sánchez-Tapia et al. (2020), que investigaram a suplementação de feijão preto em uma dieta rica em gordura e açúcar, sugeriram que o butirato pode mediar uma redução da insulina.

Com base nos dados apresentados, a suplementação com feijão-caupi biofortificado Aracê demonstrou maior eficiência na produção de ácidos graxos de cadeia curta como acetato, butirato e propionato, que acidificam o pH intestinal e pode favorecer o crescimento de bactérias benéficas. Esse ambiente ácido pode também melhorar a absorção de Fe pela barreira intestinal (GROTTO, 2008).

5.4.4. Biodisponibilidade de ferro dos feijões-caupi

A Tabela 11 evidencia os resultados referentes a concentração e ganho de hemoglobina na fase final da depleção e durante a repleção.

Tabela 11. Concentração e ganho de hemoglobina (g/dL).

Grupos	Final da depleção	Fase da repleção			
		[Hb] ¹	Ganho de Hb ¹	[Hb] ²	Ganho de Hb ²
NS	7,17 $\pm$ 0,81	9,87 $\pm$ 0,94	2,63 $\pm$ 1,04	12,97 $\pm$ 0,52 *	5,76 $\pm$ 0,97 *
HS	7,57 $\pm$ 0,81 ^a	9,45 $\pm$ 0,99 ^a	1,92 $\pm$ 0,91 ^a	12,04 $\pm$ 1,22 ^a	4,57 $\pm$ 0,89 ^a
HA	7,51 $\pm$ 0,75 ^a	9,65 $\pm$ 0,97 ^a	2,14 $\pm$ 0,92 ^a	11,93 $\pm$ 0,38 ^a	4,19 $\pm$ 0,88 ^{ab}
HT	7,56 $\pm$ 0,79 ^a	9,20 $\pm$ 0,87 ^a	1,64 $\pm$ 0,69 ^a	11,13 $\pm$ 1,25 ^{ab}	3,58 $\pm$ 0,88 ^{bc}
HP	7,41 $\pm$ 0,82 ^a	8,98 $\pm$ 0,94 ^a	1,72 $\pm$ 0,68 ^a	10,47 $\pm$ 0,76 ^b	3,04 $\pm$ 0,71 ^c

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma coluna. Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Tukey. ¹ Fase 1: 14 dias após a repleção. ² Fase 2: 34 Dias após repleção (penúltimo dia do experimento). NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. [Hb]: concentração de hemoglobina. Hb: hemoglobina.

De acordo com o esperado, a concentração de Hb ($Hb < 12 \text{ g/dL}$) ao final da depleção foi semelhante entre os animais, independentemente do tratamento recebido. Na Fase 1, tanto o ganho quanto a concentração de Hb apresentaram resultados semelhantes em todos os tratamentos, incluindo os controles. O NS teve maior ganho e concentração de Hb na Fase 2 em relação ao HS. O HA apresentou maior ganho e concentração de Hb dentre os feijões-caupi (Fase 2).

O feijão-caupi Pajeú apresentou os menores resultados em relação à concentração e ao ganho de Hb (Fase 2). Além de convencional, o genótipo apresentou alto teor de fenólicos e maior razão $Fi:Fe$ que as culturas biofortificadas, fatores esses que podem interferir na absorção do Fe.

Ademais, para avaliar a biodisponibilidade dos feijões-caupi, analisamos o valor biológico relativo (RBV) e a eficiência de regeneração de hemoglobina (HRE) (Tabela 12). Para RBV, consideramos como controle o HS, cujo RBV é fixado em 100% de Fe biodisponível (CORRÊA et al., 2020; HURRELL; EGLI, 2019).

Tabela 12. % HRE (*Hemoglobin Regeneration Efficiency*) e RBV (Valor Biológico Relativo) fase da repleção.

Grupos	RBV Fase 1 ¹	% HRE Fase 1 ¹	RBV Fase 2 ²	% HRE Fase 2 ²
NS	67,02 ± 22,94 *	37,55 ± 12,93 *	77,53 ± 8,54 *	39,55 ± 4,50 *
HS	100 ± 0,00 ^{ab}	56,18 ± 13,11 ^a	100 ± 0,00 ^a	51,18 ± 12,33 ^a
HA	112,70 ± 27,18 ^a	63,25 ± 15,37 ^a	104,80 ± 20,57 ^a	53,67 ± 10,47 ^a
HT	89,17 ± 20,88 ^b	50,00 ± 11,75 ^a	93,55 ± 17,88 ^a	47,75 ± 9,17 ^a
HP	97,73 ± 22,66 ^{ab}	54,64 ± 12,86 ^a	93,00 ± 27,12 ^a	47,55 ± 13,87 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma coluna. Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Tukey. ¹ Fase 1: 14 dias após a repleção. ² Fase 2: 34 Dias após repleção (penúltimo dia do experimento). NS: normocalórica + $FeSO_4$. HS: rica em gordura e açúcar + $FeSO_4$. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú.

Nota-se que apesar do NS ter maior ganho e concentração de Hb, o HS apresentou maiores valores para RBV e HRE nas duas fases da repleção. Os parâmetros RBV e HRE mantiveram-se semelhantes entre os grupos com dieta rica

em gordura e açúcar em ambas as fases. Com exceção do HT que apresentou menor RBV da Fase 1.

A metodologia adotada nesse estudo, depleção/repleção, baseia-se no ganho de Hb, sendo assim nota-se que houve um aumento dos níveis de Hb, oriundo da oferta das dietas contendo o sulfato ferroso ou feijão-caupi nas duas fases da repleção. Na Fase 2, a suplementação com o feijão-caupi Aracê mostrou uma melhor recuperação dos níveis de Hb, visto que se assemelhou ao HS e obteve maiores resultados em ambas as variáveis.

O objetivo ao final da fase de depleção foi alcançado, com níveis de Hb inferiores a 12 g/dL. Na metodologia de depleção/repleção utilizada, é essencial que os animais apresentem estado anêmico, para que, na fase de repleção, possam ter condições fisiológicas semelhantes ao receberem suas dietas experimentais.

A maior biodisponibilidade de Fe por parte do HS em relação ao NS, dado os resultados superiores RBV e HRE em ambas as fases, sugere-se o efeito facilitador do açúcar na absorção do Fe (GALLAGHER, 2013; GROTTTO, 2008; PISKIN et al., 2022).

Ressalta-se que o HRE prediz a eficiência da conversão do Fe em hemoglobina durante o período de repleção e o RBV reflete a eficiência que o ferro é utilizado pelo organismo considerando sulfato ferroso como 100% de Fe biodisponível (COSTA; MARTINO, 2011; SANT'ANA, 2018). Todos os grupos com feijão-caupi apresentaram semelhança ao HS para os valores do RBV em ambas as fases, pois ficaram próximos de 100%, variando de 89,17 a 112,70, assim como para HRE, sugerindo que os três tipos de feijão-caupi possuem boa biodisponibilidade de Fe, sendo que na Fase 1 destacou-se o Aracê com maior RBV (112,70). A biodisponibilidade refere-se à capacidade do organismo de absorver e utilizar o Fe em sua forma ativa, implica-se dizer que a quantidade de Fe biodisponível do HP não teria sido suficiente para a produção adequada de Hb, que possivelmente explicaria o motivo da boa biodisponibilidade de Fe do HP, mas menor produção de Hb. Semelhante ao nosso estudo, Antunes et al. (2019) e Sant'Ana et al., (2019), estudaram culturas convencionais e biofortificadas de feijão-caupi e relaram ausência de resultados significativos entre as culturas tanto para RBV, HRE, concentração e ganho de Hb.

Ambas as variedades biofortificadas quanto a convencional apresentara boa biodisponibilidade de Fe, porém a concentração de Hb é um parâmetro essencial

utilizado para avaliar o estado anêmico, e nesse quesito de recuperação de glóbulos vermelhos, o feijão Aracê se destacou na Fase 2, que abrange todo o período da repleção, demonstrando valores maiores dentre as demais culturas estudadas e mais próximos ao sulfato ferroso.

5.4.5. Biomarcadores do metabolismo do ferro

O ferro sérico, ferritina e a transferrina que são indicadores importantes na análise das condições relacionadas ao metabolismo do Fe, constam na Tabela 13.

Tabela 13. Ferro sérico e proteínas do metabolismo férrico.

Grupos	Ferritina (mg/dL)	Transferrina (mg/dL)	Ferro sérico (µg/dL)
NS	89,25 ± 44,04	104,10 ± 30,47	56,64 ± 21,19
HS	113,80 ± 25,05 ^a	110,70 ± 7,22 ^a	60,21 ± 18,83 ^a
HA	100,60 ± 23,53 ^{ab}	108,20 ± 4,61 ^a	64,79 ± 17,03 ^a
HT	46,62 ± 13,00 ^b	113,50 ± 5,64 ^a	43,20 ± 9,93 ^a
HP	65,15 ± 64,18 ^{ab}	114,60 ± 7,84 ^a	57,34 ± 28,97 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma coluna. Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú.

Os dados permaneceram semelhantes, independente do grupo estudado para transferrina e Fe sérico. Na análise de ferritina, o grupo HT teve menor valor dessa proteína, em comparação com o grupo HS, sugerindo depleção das reservas de Fe. Na deficiência de Fe os receptores de transferrina são estabilizados e há a repressão da ferritina, permitindo assim que tenha Fe apenas para fins metabólicos (FILLEBEEN et al., 2020; HENRIQUES; SIMÕES; COZZOLINO, 2020).

Biomarcadores são medidas parametrizadas de indicadores biológicos e constitui-se um caminho importante determinar o estado nutricional, além de ser um parâmetro para a manutenção de um organismo saudável (HENRIQUES; SIMÕES; COZZOLINO, 2020). A ferritina sérica não deve ser usada como único parâmetro na avaliação do estado nutricional atinente ao Fe, pois é uma proteína de fase aguda e inúmeros fatores podem levar ao seu aumento, desde síndrome metabólica até dano

hepático, ou à sua redução, como a infância e na gestação os valores encontram-se reduzidos. A literatura sugere combiná-la com o Fe sérico para avaliação do estado nutricional (HENRIQUES; SIMÕES; COZZOLINO, 2020; ROHR; BRANDENBURG; BRUNNER-LA ROCCA, 2023).

A maior concentração da ferritina no grupo do Aracê (HA) dentre os feijões, junto à semelhança dos dados para os níveis de ferro sérico e transferrina destaca a boa biodisponibilidade do Fe no organismo dos animais, a manutenção das reservas de Fe (ferritina) e níveis adequados de Fe sérico. Além disso, a produção de transferrina apresentada, não demonstra sinais de depleção férrica, pois, em condições de baixa biodisponibilidade, o corpo aumenta a produção de transferrina para otimizar o transporte do ferro sérico.

5.4.5. Efeitos dos feijões-caupi sobre os parâmetros bioquímicos

Os dados referentes aos efeitos dos feijões-caupi sobre os parâmetros bioquímicos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Indicadores bioquímicos do sangue (mg/dL).

Indicador	Grupos experimentais				
	NS	HS	HA	HT	HP
ALT	36,33 ±	39,45 ±	36,67 ±	40,17 ±	45,33 ±
	10,28	13,46 ^a	7,97 ^a	9,60 ^a	15,73 ^a
AST	100,50 ±	104,10 ±	86,92 ±	102,70 ±	101,10 ±
	39,00	29,44 ^a	33,02 ^a	34,29 ^a	40,07 ^a
CT	73,83 ±	55,45 ±	56,42 ±	54,42 ±	53,75 ±
	10,24 *	13,24 ^a	7,28 ^a	6,62 ^a	8,96 ^a
HDL-c	26,58 ±	18,82 ±	23,92 ±	21,75 ±	22,58 ±
	4,19 *	5,36 ^b	2,88 ^a	2,80 ^{ab}	3,53 ^{ab}
LDL-c	36,89 ±	25,86 ±	24,72 ±	21,58 ±	24,23 ±
	6,99 *	8,47 ^a	5,28 ^a	5,15 ^a	5,79 ^a
CT/HDL-c	2,81 ±	3,03 ±	2,38 ±	2,53 ±	2,40 ±
	0,34	0,21 ^a	0,19 ^b	0,28 ^b	0,27 ^b
LDL-c/HDL-c	1,44 ±	1,41 ±	1,05 ±	1,03 ±	1,60 ±
	0,27	0,27 ^{ab}	0,23 ^{ab}	0,24 ^b	0,77 ^a
TG	55,27 ±	54,64 ±	55,25 ±	62,00 ±	34,92 ±
	12,52	14,94 ^a	17,90 ^a	13,84 ^a	15,47 ^b
Glicemia	319,80 ±	286,60 ±	289,70 ±	346,80 ±	270,80 ±
	47,57	83,18 ^{ab}	59,99 ^{ab}	68,28 ^a	51,57 ^b

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p \leq 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma linha. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO. HS: rica em gordura com açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura com açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura com açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura com açúcar + BRS Pajeú. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. CT: colesterol total. HDL-c: *High Density Lipoprotein*. LDL-c: *Low-density Lipoproteins*. TG: triglicérides.

O HA obteve maior concentração de HDL-c do que o grupo HS. Quanto à razão CT/HDL-c todos os grupos com feijões apresentaram valores inferiores ao HS, demonstrando propriedade benéfica quando ao risco aterogênico.

Observa-se que o HP obteve maior valor na razão LDL-c/HDL-c em relação ao HT. O HP teve destaque na redução dos triglicérides, sendo inferior aos demais feijões

e ao grupo HS. Quanto à glicemia de jejum, o HP se diferiu do grupo HT, alcançando valor significativamente inferior.

No presente estudo pressupomos que não houve influência das fibras alimentares ou proteínas e demais compostos bioativos na redução do colesterol e LDL-c, sendo este um dos principais causadores da patogênese da aterosclerose, contradizendo alguns estudos científicos realizados com feijão-caupi.

O isolado de proteína de feijão-caupi adicionado a dietas hipercolesterolêmicas ao longo de 6 semanas reduziu o colesterol plasmático em ratos machos e fêmeas (ALASHI; WU; ALUKO, 2021). Além das fibras solúveis, as proteínas feijão-caupi pode funcionar de forma hipocolesterolêmica, atuando na inibição da enzima HMGCR e na redução da solubilização colesterol (MARQUES et al., 2015).

Em um cenário oposto, ressalta-se o aumento de 1 mg/dL de HDL-c pode estar associado a uma diminuição de 2 a 3% do risco de doença coronária (SANTOS et al., 2016). Os feijões-caupi apresentaram bom desempenho na redução da aterogenecidade. O Aracê aumentou a fração HDL-c e a redução significativa na razão CT/HDL-c pelos feijões indica uma proporção favorável entre o colesterol total e o HDL, o que é positivo, pois níveis adequados de HDL-c pode pressupor menor risco de complicações cardiovasculares.

Além do maior teor de fibras solúveis do Pajeú, tem-se o alto teor de fenólicos que pode ter impactado nas menores concentrações glicêmicas e de triglicérides, inibindo α -amilase, α -glicosidase e lipase. Adicionalmente, reduzem a peroxidação de LDL-c, que é fator de risco iminente para surgimento de aterogênese e protegem as células β pancreáticas (FENG et al., 2023; GASMI et al., 2022; SANTOS et al., 2016; TAN; CHANG; ZHANG, 2017; VIEIRA et al., 2023). A inibição da α -amilase permite que a glicose não seja liberada rapidamente, ocorrendo efeito hipoglicemiante e sem a ação da lipase, os triglicerídeos não são quebrados em moléculas menores que podem ser absorvidas pelo intestino delgado, levando a uma menor absorção de gorduras.

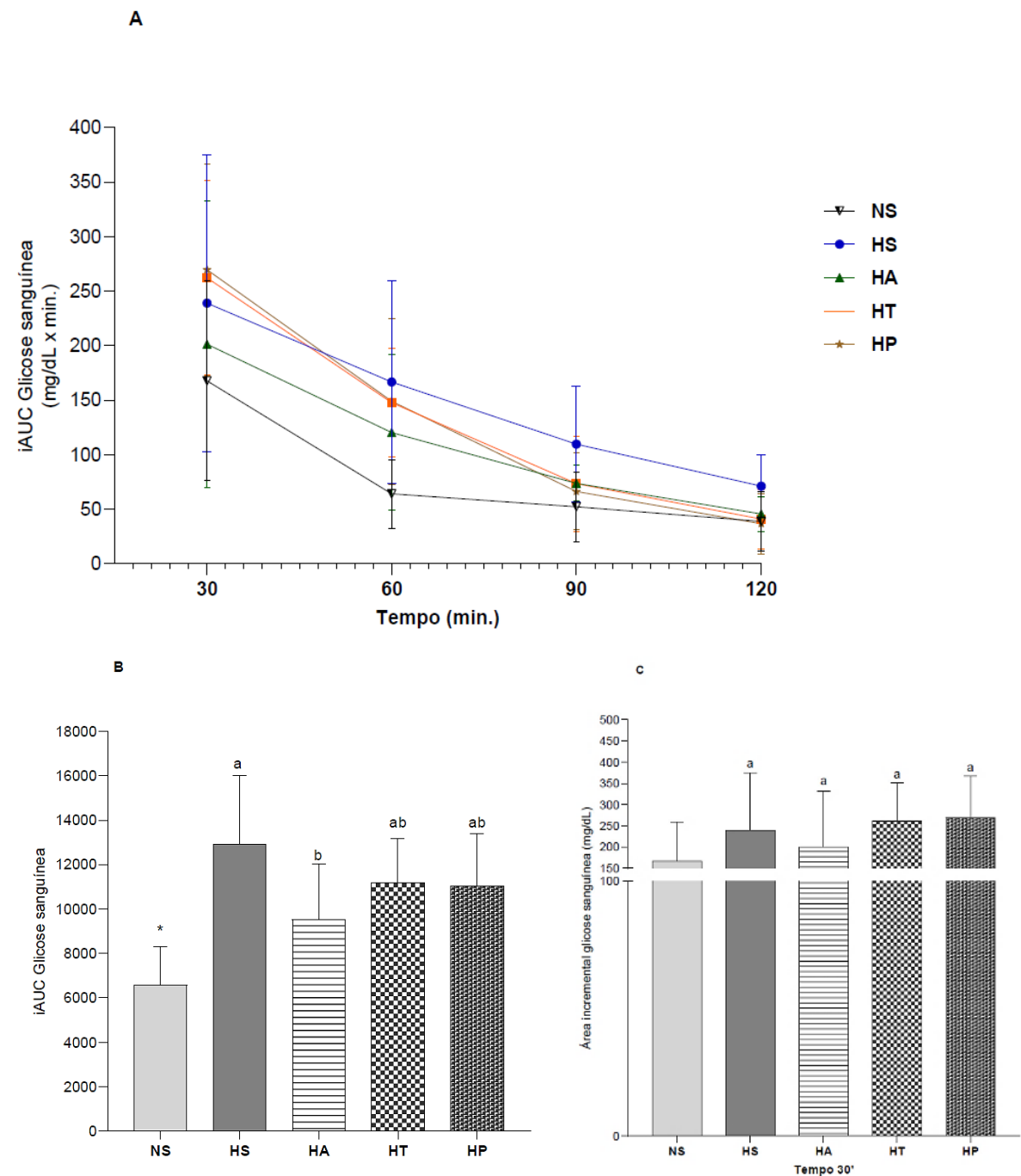
O feijão-caupi, especialmente das variedades Aracê e Pajeú, possivelmente poderia desempenhar um papel importante na promoção da saúde cardiovascular, ao influenciar positivamente o perfil lipídico. A redução na razão CT/HDL-c observados em todas as variedades testadas também contribui para a diminuição do risco de aterosclerose e outras complicações cardiovasculares. Além disso, a redução nos

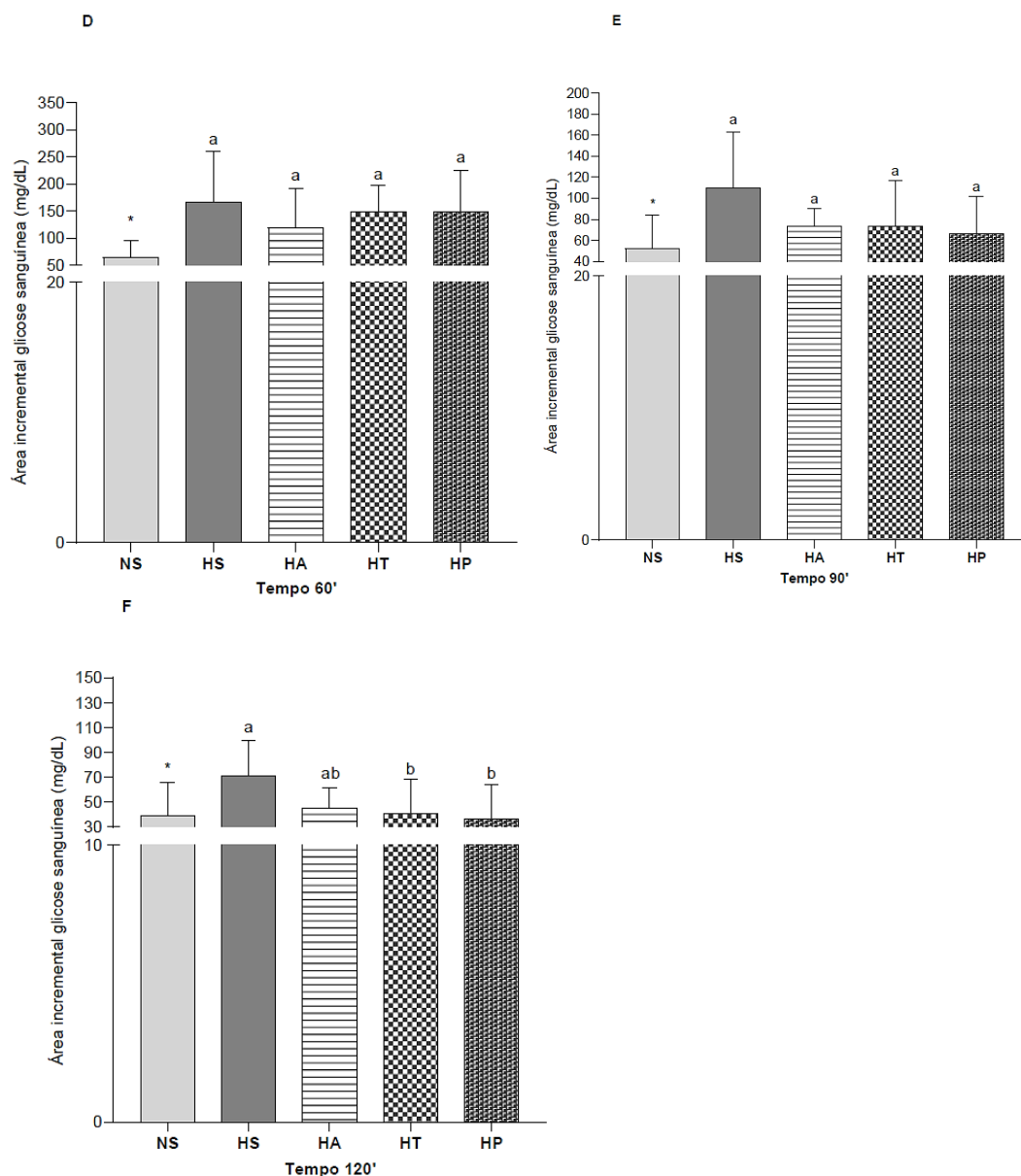
níveis de triglicerídeos e glicemia associada ao consumo do feijão-caupi Pajeú reforça seu potencial como alimento funcional.

5.4.5.1. Efeitos dos tratamentos sob a reposta glicêmica pós-prandial

Os resultados da área incremental sob a curva de glicose sanguínea (iAUC) (LIU et al., 2022) estão dispostos na Figura 12.

Figura 12. Área incremental sob a curva de glicose sanguínea (iAUC).





Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma coluna. Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Tukey. (A) iAUC referente aos tempos. (B) iAUC. (C) iAUC tempo 30 minutos. (D) iAUC tempo 60 minutos. (E) iAUC tempo 90 minutos. (F) iAUC tempo 120 minutos. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. iAUC: área incremental sob a curva de glicose sanguínea.

O NS apresentou menor iAUC, seguido pelo HA, onde ambos se diferenciaram do HS (Figura 12 B). O feijão-caupi Aracê reduziu significativamente 35,93% na iAUC quando comparamos ao HS, o HT e HP apresentaram valores (Figura 12 B). No tempo de 120 minutos HT e HP se diferenciaram do HS (Figura 12 E e F).

O baixo índice glicêmico do Aracê pode ter influenciado na menor iAUC. Silva (2022) identificou que o feijão-caupi Pajeú foi considerado com índice glicêmico moderado, enquanto Aracê e Tumucumaque, foram considerados alimentos com baixo índice glicêmico. Akhtar et al. (2019), com o uso de pó de feijão vermelho em chapatti obteve redução significativa na área incremental sob a curva. Winham et al. (2022) obtiveram menores valores de iAUCs no feijão preto integral do que no pão branco.

Leguminosas, como o feijão, são reconhecidas por conter fibras alimentares solúveis, que promovem uma digestão mais lenta, além de amido resistente e oligossacarídeos com potencial prebiótico, os quais podem resultar em menores concentrações de glicose ao longo do tempo (CÁRDENAS; ROSA; COSTA, 2016; HUBER; BEMILLER, 2019; SEAL et al., 2021). No entanto, neste estudo, observamos que o tipo de fibra alimentar pode não ter influenciado a glicemia pós-prandial. O Pajeú apresentou um maior teor de fibra solúvel e compostos fenólicos, porém não foi refletido em menor iAUC. Assim, sugerimos que o menor índice iAUC do Aracê, pode ter sido influenciado por outros compostos bioativos presentes no feijão-caupi, como proteínas, fitoquímicos e peptídeos.

5.4.5.2. Efeitos dos feijões-caupi na resistência insulínica

A resistência ou a sensibilidade à insulina foram determinadas através do HOMA-IR, Índice TyG e a razão TG/HDL-c a partir da glicemia e insulina de jejum (Tabela 15).

Tabela 15. Efeitos dos tratamentos sobre resposta insulínica.

Índice	NS	HS	HA	HT	HP
Insulina (mU/L)	6,60 ± 1,63	7,90 ± 1,97 ^a	5,29 ± 1,27 ^b	6,83 ± 1,09 ^{ab}	6,34 ± 1,02 ^{ab}
HOMA-IR	5,31 ± 1,73	5,43 ± 1,51 ^a	3,94 ± 1,32 ^a	5,61 ± 1,60 ^a	4,37 ± 1,26 ^a
TyG	9,04 ± 0,29	8,89 ± 0,45 ^{ab}	8,91 ± 0,50 ^a	9,23 ± 0,38 ^a	8,33 ± 0,66 ^b
QUICKI	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,01 ^a	0,32 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	0,31 ± 0,01 ^a
TG/HDL-c	2,13 ± 0,43 [*]	3,11 ± 1,01 ^a	2,32 ± 0,67 ^{ab}	2,95 ± 0,72 ^a	1,60 ± 0,77 ^b

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS na mesma linha. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e seguido do teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica

em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*. TyG: Índice triglicerídeos/glicose. TG/HDL-c: razão triglicerídeos/HDL-c. QUICKI: *Quantitative Insulin sensitivity Check Index*.

Após 8 semanas de intervenção o HA apresentou menor concentração de insulina e o HP apresentou menor índice TyG e razão TG/HDL-c. Os índices QUICKI, HOMA-IR, TyG e a razão TG/HDL-c são metodologias utilizadas para avaliar a resistência à insulina, refletindo possíveis manifestações metabólicas associadas à síndrome metabólica. O HOMA-IR apresenta variações de acordo com características demográficas, como idade, sexo e etnia, o que torna difícil a determinação de um ponto de corte ideal. Da mesma forma, o ponto de corte do TyG também varia. A literatura científica sugere os seguintes valores de referência para resistência à insulina e síndrome metabólica em humanos: razão TG/HDL-C > 2,28, índice TyG > 7,97, HOMA-IR > 2,13 e QUICKI < 0,357 (ASLAN ÇIN et al., 2020; HREBÍCEK et al., 2002; TAHAPARY et al., 2022; UNGER et al., 2014). Para ratos, não foram encontrados padrões de referência estabelecidos.

Contrapondo alguns dados presentes na literatura sobre feijões, em nosso estudo não obtivemos implicações dos feijões-caupi para HOMA-IR e QUICKI. Zhao et al. (2021), com a suplementação de feijão azuki em uma dieta *high-fat* obtiveram níveis séricos de insulina e HOMA-IR melhorados, aumentando a sensibilidade insulínica. Camundongos alimentados com dieta rica em gordura suplementada com feijão preto apresentaram índice de HOMA-IR 87% menor do que o outro grupo controle sem feijão (TAN et al., 2021). Feijões de sementes coloridas, Azufrain e Flor de Junio adicionadas em uma dieta rica em gordura e frutose em ratos mostraram-se capazes de reduzir o HOMA-IR significativamente (PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2023).

A suplementação com o feijão Aracê biofortificado demonstrou melhor atuação para manutenção da sensibilidade à insulina, evidenciada pela menor concentração sérica de insulina, em consonância com a redução do iAUC (Figura 12 B). O feijão Pajeú, por sua vez, apresentou um menor índice TyG e uma razão TG/HDL-c mais favorável, mesmo em condições de dieta rica em gordura e açúcar, o que é considerado desejável. Um menor índice TyG pode sugerir melhor controle dos níveis de glicose e triglicerídeos, o que geralmente está associado a um menor risco de desenvolver diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Da mesma forma, uma menor razão TG/HDL-c sugere um perfil lipídico mais equilibrado e protetor contra

doenças cardíacas. Um estudo de coorte retrospectivo com 17.746 pessoas associou o índice de TyG a uma glicemia de jejum alterada (LIU et al., 2024). Em nosso estudo, o menor índice TyG do HP é concomitante a menor glicemia e triglicérides de jejum, sugerindo o efeito dos compostos bioativos.

No geral, sugere que a suplementação com as variedades de feijão-caupi Aracê e Pajeú poderiam mitigar complicações cardiovasculares associadas a dietas ricas em gordura e açúcar, através da manutenção de parâmetros preditores de resistência à insulina, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares. Essas variedades, portanto, apresentam potenciais propriedades funcionais, como aliados na redução de distúrbios metabólicos e na promoção da saúde cardiometabólica.

5.4.7. Efeito dos feijões-caupi na saúde hepática

Os resultados sobre os efeitos dos feijões-caupi na saúde hepática estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Peso do fígado, índice hepatossomático, peso corporal final e perfil lipídico hepático.

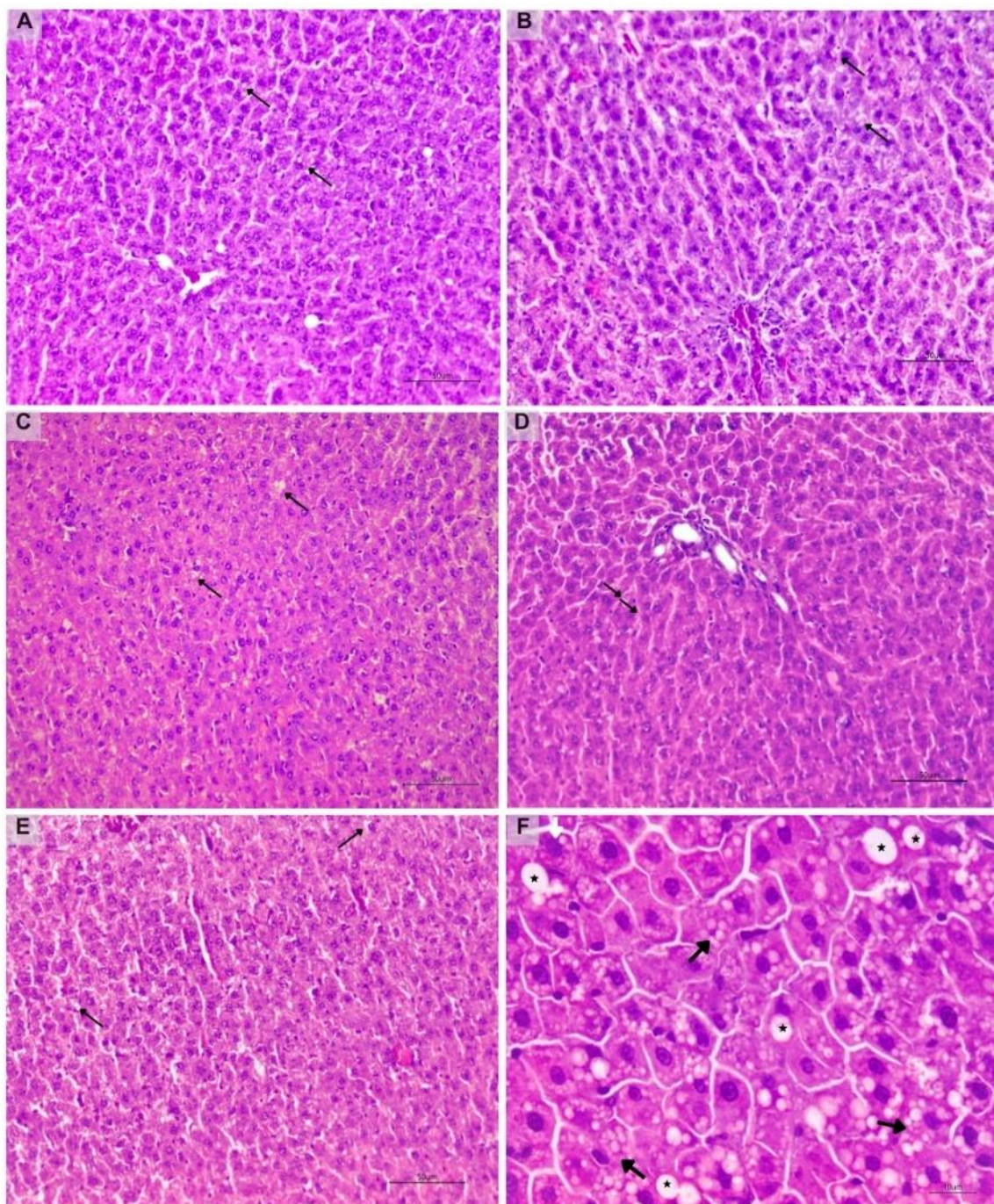
Marcadores	Grupos experimentais				
	NS	HS	HA	HT	HP
Peso do fígado (g)	10,26 ± 1,40	9,70 ± 1,27 ^a	10,28 ± 1,75 ^a	10,80 ± 1,73 ^a	9,89 ± 1,73 ^a
Peso corporal final (g)	308,00 ± 32,62	311,00 ± 50,87 ^a	334,90 ± 39,22 ^a	342,40 ± 54,31 ^a	332,50 ± 57,98 ^a
Índice hepato-somático	3,33 ± 0,31 *	3,16 ± 0,45 ^a	3,08 ± 0,49 ^a	3,17 ± 0,37 ^a	2,99 ± 0,27 ^a
Excreção lipídica (%)	4,12 ± 0,59 *	5,52 ± 1,59 ^a	5,90 ± 2,18 ^a	5,87 ± 1,10 ^a	5,84 ± 1,27 ^a
CT (mg/dL)	68,72 ± 7,36 *	82,71 ± 12,27 ^a	80,10 ± 13,29 ^a	92,39 ± 11,26 ^a	89,62 ± 13,80 ^a
TG (mg/dL)	184,90 ± 30,92 *	309,70 ± 124,40 ^a	261,80 ± 50,54 ^a	314,80 ± 95,96 ^a	281,20 ± 93,13 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste t não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. CT: colesterol total. TG: triglicérides.

O teste ANOVA seguido de Tukey não identificou diferença significativa em nenhuma das variáveis mostradas na Tabela 16, comparando as dietas ricas em gordura e açúcar suplementadas ou não com feijão-caupi.

A fotomicroscopia das lâminas está apresentada na Figura 13 e a classificação da esteatose através do escore na Tabela 17.

Figura 13. Fotomicroscopia de fígados de ratos Wistar não tratado e tratados após 8 semanas com dieta rica em gordura e açúcar.



(A) NS: normocalórica + FeSO₄; (B) HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄; (C) HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê; (D) HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque; (E) HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. (F): Evidenciação de macrovesículas e microvesículas no citoplasma de hepatócitos no grupo HP. Asterisco: macrovesículas. Seta preta: microvesículas. Hematoxilina e eosina, 20x (A, B, C, D, E), barra = 50 µm, 60x (F), barra = 10 µm.

Tabela 17. Classificação da esteatose (n =6).

	Esteatose			Inflamação	Fibrose
	Macrovesicular	Microvesicular	Megalocitose		
NS	0,00 ± 0,00	0,67 ± 0,82	N.d.	N.d.	N.d.
HS	0,33 ± 0,52 ^a	1,33 ± 1,03 ^a	N.d.	N.d.	N.d.
HA	0,00 ± 0,00 ^a	1,17 ± 0,98 ^a	N.d.	N.d.	N.d.
HT	0,00 ± 0,00 ^a	0,50 ± 0,55 ^a	N.d.	N.d.	N.d.
HP	0,17 ± 0,41 ^a	1,67 ± 0,82 ^a	N.d.	N.d.	N.d.

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Teste *t* não pareado com significância estatística considerada de $p < 0,05$ entre grupos NS e HS. Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey. NS: normocalórica + FeSO₄. HS: rica em gordura e açúcar + FeSO₄. HA: rica em gordura e açúcar + BRS Aracê. HT: rica em gordura e açúcar + BRS Tumucumaque. HP: rica em gordura e açúcar + BRS Pajeú. N.d.: não detectado.

No que diz respeito à classificação da esteatose por escore, independentemente do grupo avaliado, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto à presença de macro e microvesículas ($p > 0,05$). Na análise morfológica dos fígados, tanto macrovesículas quanto microvesículas foram identificadas, sendo estas últimas em maiores proporções em todos os grupos avaliados. Além disso, alterações como inflamação, fibrose e megalocitose não foram evidenciados nos cortes histológicos avaliados.

Diversas pesquisas têm relacionado o consumo de feijão com a modulação de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos livres, como SREBP-1, Hmgcr e Acat 2, além de promover o aumento da expressão de genes relacionados à oxidação, como PPARα. Em estudo com hamsters suplementados com feijão carioca, observou-se uma redução significativa no colesterol hepático, além de maiores concentrações de colesterol fecal, quando comparados aos que receberam apenas uma dieta rica em gordura saturada (HERNANDEZ-VELAZQUEZ et al., 2020; NGUYEN et al., 2019).

Uma alimentação com alto teor de gordura saturada e carboidrato simples pode contribuir para a gênese ou agravamento de doenças hepáticas devido à hepatotoxicidade (MAZZA; SANTANA; OLIVEIRA, 2009). Entretanto, embora o feijão seja reconhecido por seus compostos bioativos benéficos à saúde hepática, e mesmo com a administração de uma dieta rica em gordura e açúcar, o tempo de intervenção de 8 semanas utilizado neste estudo não foi suficiente para promover alterações significativas na esteatose hepática.

Portanto, estudos adicionais são necessários para uma compreensão mais aprofundada dos efeitos do feijão-caupi no fígado. Sugerimos que futuras pesquisas considerem a análise da expressão gênica de genes envolvidos no metabolismo lipídico para uma avaliação mais detalhada dos efeitos do feijão-caupi.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram a efetividade do programa de biofortificação, evidenciada pelas concentrações significativamente superior de ferro nos grãos dos feijões-caupi biofortificados. Esse aumento contribuiu para a recuperação da hemoglobina e para maior concentração de ferritina do Aracê. No entanto, é importante destacar que o aumento do teor de ferro nos alimentos não se traduz diretamente em maior biodisponibilidade no organismo. Todos os feijões-caupi testados, incluindo a variedade Pajeú, apresentaram resultados semelhantes aos do sulfato ferroso em relação à RBV (valor biológico relativo) e à HRE (eficiência de recuperação de hemoglobina).

Apesar do tempo de intervenção com a dieta elevada em gordura e açúcar não ter induzido obesidade ou esteatose hepática, nossos resultados sugerem que os compostos bioativos presentes no feijão-caupi tiveram efeitos benéficos sobre o metabolismo lipídico. Além de uma menor razão CT/HDL-c em todos os grupos tratados com feijão-caupi”, os feijões promoveram alterações positivas em marcadores de colesterol, triglicérides e de resistência insulínica, sendo possíveis beneficiadores da saúde cardiovascular. Esses achados indicam um potencial benefício na redução de complicações associadas a dislipidemias, intolerância glicêmica e resistência insulínica.

A oferta do feijão-caupi bifortificado Aracê promoveu maior produção de acetato, butirato e propionato, o que pode ter contribuído para o menor valor de pH cecal. Estes podem mediar outros efeitos positivos sobre a resistência insulínica, além de favorecerem a absorção de ferro devido ao pH ácido.

Nosso estudo analisou simultaneamente diversos biomarcadores relacionados ao metabolismo do ferro, lipídico, glicídico e à fermentação da microbiota intestinal (acetato, butirato, propionato e pH), além de aspectos da saúde hepática. Outros modelos animais e de dieta poderiam ser testados em estudos futuros para indução de obesidade e outros biomarcadores poderiam ser adicionados para melhor compreensão dos efeitos no metabolismo, como SREBP-1, Hmgcr, Acat 2 e PPAR α .

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o feijão-caupi é uma estratégia dietética de baixo custo, sustentável e com boa qualidade nutricional. O feijão Aracê se mostra promissor no combate à anemia e, junto ao Pajeú, poderiam contribuir para a saúde cardiovascular e a manutenção de parâmetros preditores de resistência insulínica e síndrome metabólica, especialmente em dietas com alto teor de gordura e açúcar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDESSELAM, I. et al. Time course of cardiometabolic alterations in a high fat high sucrose diet mice model and improvement after GLP-1 analog treatment using multimodal cardiovascular magnetic resonance. **Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance**, v. 17, n. 95, 2015.

ABE, I.; ISLAM, F.; LAM, A. K. Y. Glucose Intolerance on Pheochromocytoma and Paraganglioma - The Current Understanding and Clinical Perspectives. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 2020.

ABERA, S.; YOHANNES, W.; CHANDRAVANSI, B. S. Effect of Processing Methods on Antinutritional Factors (Oxalate, Phytate, and Tannin) and Their Interaction with Minerals (Calcium, Iron, and Zinc) in Red, White, and Black Kidney Beans. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2023, n. 6762027, 2023.

ADDEPALLI, V.; SURYAVANSI, S. V. Catechin attenuates diabetic autonomic neuropathy in streptozotocin induced diabetic rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1517–1523, 2018.

AKHTAR, S. et al. Glycemic and Insulinemic Responses of Vegetables and Beans Powders Supplemented Chapattis in Healthy Humans: A Randomized, Crossover Trial. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

AKISSOÉ, L. et al. Current Consumption of Traditional Cowpea-Based Dishes in South Benin Contributes to at Least 30% of the Recommended Intake of Dietary Fibre, Folate, and Magnesium. **Nutrients**, v. 15, n. 6, 2023.

ALASHI, A. M.; WU, H.; ALUKO, R. E. Indigestible cowpea proteins reduced plasma cholesterol after long-term oral administration to Sprague-Dawley rats. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 3, n. 16, 2021.

ALENCAR, L. L. DE; HENRIQUES, G. S.; COZZOLINO, S. M. F. Ferro. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.

ALFARO-DIAZ, A.; ESCOBEDO, A.; LUNA-VITAL, D. A; CASTILLO-HERRERA, G.; MOJICA, L. Common beans as a source of food ingredients: Techno-functional and biological potential. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 4, p. 2910 - 2944, 2023.

ALHAMAWI, R. M. et al. Free sugar intake is associated with reduced proportion of circulating invariant natural killer T cells among women experiencing overweight and obesity. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2024.

ALMEIDA, M.A.; FÁVARO, S. P.; GALVANI, F. Efeito da Umidade nos Teores de Fibras Alimentares em Polpa de Bociuva Processada Mecanicamente. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA PANTANAL E UFMS, 6., 2012, Corumbá. **Resumo** [...] Corumbá: Embrapa Pantanal, 2012, p. 15.

AL-NASEEM, A.; SALLAM, A.; CHOUDHURY, S.; THACHIL, J. Iron deficiency without anaemia: A diagnosis that matters. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 21, n. 2, p. 107-113, 2021.

AN, S. M.; CHO, S. H.; YOON, J. C. Adipose Tissue and Metabolic Health. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 47, n. 5, p. 595 - 611, 2023.

ANDERSON, G. J. Iron biofortification: Who gives a bean? **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 11, p. 2841 - 2842, 2020.

ANTUNES, P. T. et al. Bioavailability of iron and the influence of Vitamin A in biofortified foods. **Agronomy**, v. 9, n. 12, 2019.

AOAC - Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. 16th ed. Washington D.C., 1998.

AOAC - Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. 21th ed. Rockville, 2019.

ARAÚJO, C. DA S. et al. Princípios da secagem de alimentos. Em: ROBERTO, C. D.; TEIXEIRA, L. J. Q.; CARVALHO, R. V. DE (Org.). **Tópicos especiais em ciência e tecnologia de alimentos**. v. 1. Vitória: Edufes, 2022. p. 239 - 257.

ASCHEMEYER, S. et al. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. **Blood**, v. 131, n. 8, p. 899 - 910, 2018.

ASHRAF, J. et al. Effect of thermosonication pre-treatment on mung bean (*Vigna radiata*) and white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins: Enzymatic hydrolysis, cholesterol lowering activity and structural characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, n. 105121, 2020.

ASLAN ÇIN, N. N.; YARDLMCL, H.; KOÇ, N.; UÇAKTÜRK, S. A.; OK, M. A. Triglycerides/high-density lipoprotein cholesterol is a predictor similar to the triglyceride-glucose index for the diagnosis of metabolic syndrome using International Diabetes Federation criteria of insulin resistance in obese adolescents: A cross-sectional study. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 777 - 784, 2020.

ASP, N. G.; JOHANSSON, C.-G.; HALLMER, H.; SILJESTRÖM, M. Rapid Enzymatic Assay of Insoluble and Soluble Dietary Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 476 - 482, 1983.

AVNEE; SOOD, S.; CHAUDHARY, D. R.; JHORAR, P.; RANA, R. S. Biofortification: an approach to eradicate micronutrient deficiency. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, n. 1233070, 2023.

BARBER, T. M.; KABISCH, S.; PFEIFFER, A. F.H.; WEICKERT, M. O. The health benefits of dietary fibre. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 1 - 17, 2020.

BERNARDIS, L. L. Prediction of Carcass Fat, Water and Lean Body Mass from Lee's "Nutritive Ratio" in Rats with Hypothalamic Obesity. **Experientia**, v. 26, n. 7, p. 789–790, 1970.

BIELIK, V.; KOLISEK, M. Bioaccessibility and bioavailability of minerals in relation to a healthy gut microbiome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1. ed. Curitiba: Appris, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, M. DA S. **Relatório de Recomendação- Protocolo e Diretrizes: Anemia por Deficiência de Ferro**. Brasília: Ministério da Saúde, 2023a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sobrepeso e obesidade como problemas de saúde pública. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/eu-queroter-peso-saudavel/noticias/2022/sobrepeso-e-obesidade-como-problemas-de-saude-publica>>. Acesso em: 23/04/2024b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anemia ferropriva: deficiência de ferro é um dos fatores que podem estar associados à mortalidade materna. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/anemia-ferropriva-deficiencia-de-ferro-e-um-dos-fatores-que-podem-estar-associados-a-mortalidade-materna>>. Acesso em: 26/04/2023c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Painel de Indicadores de Saúde – Pesquisa Nacional de Saúde. Disponível em: <<https://www.pns.iciet.fiocruz.br/painel-de-indicadores-mobile-desktop/>>. Acesso em: 22/05/2024a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Excesso de peso e obesidade. Disponível em: <<https://aps.saude.gov.br/ape/promocaosaude/excesso>>. Acesso em: 24/04/2023b.

BUDREVICIUTE, A. et al. Management and Prevention Strategies for Non-communicable Diseases (NCDs) and Their Risk Factors. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. 574111, 2020.

BURNS, R. E. Method for estimation of tannin in grain sorghum. **Agronomy Journal**, v. 63, p. 511 - 512, 1971.

CÁRDENAS, L. DE L. A. R.; ROSA, C. DE O. B.; COSTA, N. M. B. Propriedades Funcionais do Feijão. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (Org.). **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. p. 171 - 187.

CARLI, E.; COLLI, C. Minerais. In: ROSSI, L.; POLTRONIERI, F. (Eds.). **Tratado de nutrição e dietoterapia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

CARTLAND, G. F.; KOCH, F. C. A micromodification of the Keith-Rowntree plasma-dye method for the estimation of blood volume in the rat. **Am. J. Physiol**, v. 85, p. 540–545, 1928.

CARVALHO, K. M. B. DE; DUTRA, E. S. Obesidade. In: CUPPARI, L. (Coord.). **Guia de Nutrição: clínica no adulto**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2014. p. 185 - 214.

CARVALHO, K. M. B. DE; DUTRA, E. S.; ARAÚJO, M. S. M. Obesidade e Síndrome Metabólica. In: CUPPARI, L. (Coord.). **Nutrição: nas doenças crônicas não-transmissíveis**. 1. ed. Barueri, SP: Manole Ltda, 2009. p. 71 - 142.

CHARLEBOIS, E.; PANTOPOULOS, K. Nutritional Aspects of Iron in Health and Disease. **Nutrients**, v. 15, n. 11, 2023.

CLEMENTE-SUÁREZ, V. J.; BELTRÁN-VELASCO, A. I.; REDONDO-FLÓREZ, L.; TORNERO-AGUILERA, J. F. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 15, n. 12, 2023.

COELHO, R. C.; BARSOTTI, R. C. F.; MALTEZ, H. F.; JÚNIOR, C. A. L.; BARBOSA, H. S. Expanding information on the bioaccessibility and bioavailability of iron and zinc in biofortified cowpea seeds. **Food Chemistry**, v. 347, 2021.

COQUEIRO, A. Y.; BONVINI, A.; TIRAPEGUI, J. Biodisponibilidade de proteínas. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.

CORRÊA, S. R.; BRIGIDE, P.; VAZ-TOSTES, M. G.; COSTA, N. M. B. Cultivars of biofortified cowpea and sweet potato: Bioavailability of iron and interaction with vitamin A in vivo and in vitro. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 816 - 823, 2020.

COSTA, J. A.; GOMES, J.M.G.; CÂNDIDO, F.G.; ALFENAS, R.C.G. Índice glicêmico e Obesidade. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (Org.). **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. p. 441 - 452.

COSTA, N. M. B. Necessidades Nutricionais e Dietas Experimentais de Roedores de Laboratório. In: COSTA, N. M. B. et al. (Org.). **Nutrição Experimental: Teoria e Prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2014. p. 47 - 64.

COSTA, N. M. B.; MARTINO, H. S. D. Biodisponibilidade de Minerais. In: SILVA, S. M. C. S. DA; MURA, J. D. P. (Eds.). **Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2011. p. 103 - 134.

COSTA, N. M. B.; MARTINO, H. S. D. Biodisponibilidade de Minerais. In: COSTA, N. M. B. (Org.). **Nutrição Experimental: Teoria e Prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2014. p. 111 - 131.

DAS, N. K. et al. Microbial Metabolite Signaling Is Required for Systemic Iron Homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 115 - 130, 2020.

DEWIDAR, B.; KAHL, S.; PAFILI, K.; RODEN, M. Metabolic liver disease in diabetes – From mechanisms to clinical trials. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 111, 2020.

DIAS, D. M.; COSTA, N. M. B.; NUTTI, M. R.; TAKO, E.; MARTINO, H. S. Advantages and limitations of in vitro and in vivo methods of iron and zinc bioavailability evaluation in the assessment of biofortification program effectiveness. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2136 - 2146, 2018.

DIAS, D. M. et al. Staple food crops from brazilian biofortification program have high protein quality and hypoglycemic action in wistar rats. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 40, n. 1, p. 140 - 149, 2020.

DIGNASS, A.; FARRAG, K.; STEIN, J. Limitations of Serum Ferritin in Diagnosing Iron Deficiency in Inflammatory Conditions. **International Journal of Chronic Diseases**, v. 2018, p. 1 - 11, 2018.

DOMA, K. M.; DOLINAR, K. F.; DAN, D. R.; WOLEVER, T. M.S.; DUNCAN, A. M. Canned Beans Decrease Serum Total and LDL Cholesterol in Adults with Elevated LDL Cholesterol in a 4-wk Multicenter, Randomized, Crossover Study. **Journal of Nutrition**, v. 151, n. 12, p. 3701 - 3709, 2021.

DWIVEDI, S. L.; GARCIA-OLIVEIRA, A. L.; GOVINDARAJ, M.; ORTIZ, R. Biofortification to avoid malnutrition in humans in a changing climate: Enhancing micronutrient bioavailability in seed, tuber, and storage roots. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, n. 1119148, 2023.

ELLIOTT, H.; WOODS, P.; GREEN, B. D.; NUGENT, A. P. Can sprouting reduce phytate and improve the nutritional composition and nutrient bioaccessibility in cereals and legumes? **Nutrition Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 138 - 156, 2022.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Introdução à biofortificação. e-Campo: vitrine de capacitações online da Embrapa. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2020/outubro/alimentacao-saudavel-e-aliada-na-prevencao-da-obesidade-e-doencas-cronicas>>. Acesso em: 27/02/2023.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. **Rede BioFORT**. Disponível em: <Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária>. Acesso em: 30/01/2024.

ESCOBEDO, A. et al. Common bean baked snack consumption reduces apolipoprotein b-100 levels: A randomized crossover trial. **Nutrients**, v. 13, n. 11, 2021.

FAO - Food and Agriculture Organization. Dia Mundial das Leguminosas: para um futuro sustentável. Disponível em: <<https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1630211/>>. Acesso em: 10/01/2023.

FARIAS, D. P.; ARAÚJO, F.F.; NERI-NUMA, I.A. PASTORE, G.M. Antidiabetic potential of dietary polyphenols: A mechanistic review. **Food Research International**, v. 145, 2021.

FELIPE, F. D.; RAMOS, D. L.; MERTENS, F.; CARVALHEIRO, L. G. Native pollinators improve the quality and market value of common bean. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 349, n. 108432, 2023.

FENG, Q. et al. Protective Effects of White Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) against Diet-Induced Hepatic Steatosis in Mice Are Linked to Modification of Gut Microbiota and Its Metabolites. **Nutrients**, v. 15, n. 13, 2023.

FERREIRA, C. M.; BARRIGOSSO, J. A. F. **Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar**. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 2021.

FERREIRA, W.M.; LIMA, G. R.; MACEDO, DAVID C.; JÚNIOR, M. F.; PIMENTAL, C. Cowpea: A low-cost quality protein source for food safety in marginal areas for agriculture. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 12, 2022.

FILHO, F. R. F. et al. **Feijão-Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios: Introdução**. 1. ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011.

FILISSETTI, T. M. C. C.; LOBO, A. R.; COLLI, C. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org.). **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.

FILLEBEEN, C. et al. Regulatory Connections between Iron and Glucose Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, 2020.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 497 - 509, 1957.

FONTELLES, M. J.; SIMÕES, M. G.; ALMEIDA, J. C. A.; FONTENELLES, R. G. S. Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. **Revista Paraense de Medicina**, v. 28, p. 57–64, 2010.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **CLINICAL CHEMISTRY**, v. 18, n. 6, p. 499 - 502, 1972.

GALLAGHER, M. L. Ingestão: Os Nutrientes e seu Metabolismo. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. (Eds.). **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

GASMI, A. et al. Polyphenols in Metabolic Diseases. **Molecules**, v. 27, n. 19, 2022.

GOMES, M. J. C. et al. Zinc Biofortified Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Soluble Extracts Modulate Assessed Cecal Bacterial Populations and Gut Morphology *In Vivo* (*Gallus gallus*). **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 27, n. 5, 2022.

GRANCIERI, M. et al. Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 666 - 675, 2017.

GRANT, B. L.; HAMILTON, K. K. Terapia Nutricional Médica para Prevenção, Tratamento e Recuperação do Câncer. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. (Eds.). **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

GRDEŃ, P.; JAKUBCZYK, A. Health benefits of legume seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 103, n. 13, p. 5213 - 5220, 2023.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, 2008.

GUO, W.; Zhou, Q.; Jia, Y.; Xu, J. Increased levels of glycated hemoglobin A1c and iron deficiency anemia: A review. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 8371–8378, 2019.

HENRIQUES, G. S.; SIMÕES, P. M. R.; COZZOLINO, S. M. F. Biomarcadores para nutrientes essenciais. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.

HERNANDEZ-VELAZQUEZ, I. et al. Black bean protein concentrate ameliorates hepatic steatosis by decreasing lipogenesis and increasing fatty acid oxidation in rats fed a high fat-sucrose diet. **Food and Function**, v. 11, n. 12, p. 10341 - 10350, 2020.

HILTON, C.; SABARATNAM, R.; DRAKESMITH, H.; KARPE, F. Iron, glucose and fat metabolism and obesity: an intertwined relationship. **International Journal of Obesity**, v.47, n.7, p. 554 - 563, 2023.

HORST, M. A.; CRUZ, A. DE C.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.

HOU, D. et al. Mung bean (*Vigna radiata* L.): Bioactive polyphenols, polysaccharides, peptides, and health benefits. **Nutrients**, v. 11, n. 6, 2019.

HREBÍČEK, J.; JANOUT, V.; MALINCÍKOVÁ, J.; HORÁKOVÁ, D.; CÍZEK, L. Detection of insulin resistance by simple quantitative insulin sensitivity check index QUICKI for epidemiological assessment and prevention. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 144 - 147, 2002.

HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Eds.). **Química de alimentos Fennema**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2019. p. 91 - 174.

HUO, C.; LI, G.; HU, Y.; SUN, H. The Impacts of Iron Overload and Ferroptosis on Intestinal Mucosal Homeostasis and Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, 2022.

HURRELL, R.; EGLI, I. Fortification of Food: Principles and Practice. In: MEANS, R. T. (Ed.). **Nutritional Anemia: Scientific Principles, Clinical Practice, and Public Health**. 1. ed. United Kingdom: University Printing House, 2019. p. 16 - 30.

JAYATHILAKE, C. et al. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 4793–4806, 2018.

JESUS, R. P. DE et al. Doenças hepáticas. In: CUPPARI, L. (Coord.). **Guia de Nutrição: clínica no adulto**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2014. p. 413 - 454.

JHA, A. B.; WARKENTIN, T. D. Biofortification of pulse crops: Status and future perspectives. **Plants**, v. 9, n. 1, 2020.

JÚNIOR, A. S. A. et al. **Feijão-caupi**. Embrapa, 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/feijao-caupi>>. Acesso em: 21/01/2024.

KATZ, A. et al. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Printed**, v. 85, n. 7, 2000.

KAUR, P. et al. Effect of cooking and storage temperature on resistant starch in commonly consumed Indian wheat products and its effect upon blood glucose level. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, 2023.

KILUA, A. et al. Whole kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) and bean hull reduce the total serum cholesterol, modulate the gut microbiota and affect the caecal fermentation in rats. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, n. 100232, 2020.

KITANO-OKADA, T. et al. Safety and efficacy of adzuki bean extract in subjects with moderate to high LDL-C: A randomized trial. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 83, n. 5, p. 933 - 941, 2019.

LAL, A. Iron in Health and Disease: An Update. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 1, p. 58 - 65, 2020.

LAM, B. C. C. et al. The impact of obesity: a narrative review. **Singapore medical journal**, v. 64, n. 3, p. 163 - 171, 2023.

LANG, S.; SCHNABL, B. Microbiota and Fatty Liver Disease - the Known, the Unknown, and the Future. **Cell Host and Microbe**, v. 28, n. 2, p. 233 - 244, 2020.

LEUNG, A. K.; LAM, J. M.; WONG, A. H.C.; HON, K. L.; LI, X. Iron Deficiency Anemia: An Updated Review. **Current Pediatric Reviews**, v. 20, n. 3, p. 339 - 356, 2024.

LI, L. et al. Improvement in Mung Bean Peptide on High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice Using Untargeted Serum Metabolomics. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022a.

LI, L. et al. Regulatory Effect of Mung Bean Peptide on Prediabetic Mice Induced by High-Fat Diet. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022b.

- LI, Y. et al. The roles and applications of short-chain fatty acids derived from microbial fermentation of dietary fibers in human cancer. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, n. 1243390, 2023.
- LIANG, W. et al. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.
- LIBERAL, Â.; PINELA, J.; VÍVAR-QUINTANA, A. M.; FERREIRA, I. C.F.R.; BARROS, L. Fighting iron-deficiency anemia: Innovations in food fortificants and biofortification strategies. **Foods**, v. 9, n. 12, 2020.
- LIMA, S. L. S. et al. Whole flour and protein hydrolysate from common beans reduce the inflammation in BALB/c mice fed with high fat high cholesterol diet. **Food Research International**, v. 122, p. 330–339, 2019.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; SILVA, G. S. B.; LIMA, D. E. S. Total phenolics and antioxidant activity of the aqueous extract of mung bean sprout (*Vigna radiata* L.). **Revista Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 53 - 57, 2004.
- LIU, D. et al. Protective effects of mung bean (*Vigna radiata* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) against high-fat-induced oxidative stress. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 12, p. 4063 - 4075, 2019.
- LIU, J.; Li, Q.; Yang, Y.; Ma, L. Iron metabolism and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis and systematic review. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 11, n. 4, p. 946–955, 2020.
- LIU, J.; YI, F.; DUAN, K.; LIU, H. Triglyceride-glucose index is associated with the risk of impaired fasting glucose in Chinese elderly individuals. **Nature**, v.14, n. 16033, 2024.
- LIU, K. F. et al. Comparison of area under the curve in various models of diabetic rats receiving chronic medication. **Archives of Medical Science**, v. 18, n. 4, p. 1078 -1087, 2022.
- LIYANAGE, R. et al. Boiled, sprouted, and raw cowpea-incorporated diets modulate high-fat diet-induced hypercholesterolemia in rats. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 1762 - 1769, 2018.
- LOTTENBERG, A. M. P.; UONACORSO, V. B. Dislipidemias. In: CUPPARI, L. (Coord.). **Nutrição nas doenças crônicas não-transmissíveis**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 191 - 217.
- LOUSHIGAM, G.; SHANMUGAM, A. Modifications to functional and biological properties of proteins of cowpea pulse crop by ultrasound-assisted extraction by ultrasound-assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.97, n.106448,2023.
- MA, S.; YEOM, J.; LIM, Y. H. Specific activation of hypoxia-inducible factor-2 α by propionate metabolism via a β -oxidation-like pathway stimulates MUC2 production in intestinal goblet cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 155, 2022.

MACLEAN, W. et al. Food energy – Methods of analysis and conversion factors. In: **Food and Agriculture Organization of the United Nations Technical Workshop Report**. Beltsville, MD, USA: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, 2003. p. 8 - 9.

MAHONEY, A. W.; VANORDEN, C. C.; HENDRICKS, G. Efficiency of Converting Food Iron into Hemoglobin by the Anemic Rat. **Nutrition and Metabolism**, v. 17, p. 223 - 230, 1974.

MARCHIONI, D. M. L.; FISBERG, R. M. Dieta, nutrição e prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis. In: CUPPARI, L. (Coord.). **Nutrição: nas doenças crônicas não-transmissíveis**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 1 - 25.

MARQUES, M. R. et al. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chemistry**, v. 168, p. 288–293, 2015.

MARREIRO, D. N.; CRUZ, K. J. C.; MELO, S. R. DE S. Minerais e obesidade. In: COZZOLINO, S. M. F. (Ed.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.

MATEMU, A.; NAKAMURA, S.; KATAYAMA, S. Health benefits of antioxidative peptides derived from legume proteins with a high amino acid score. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2021.

MATHERS, J. C. Dietary fibre and health: the story so far. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 82, n. 2, p. 120 - 129, 2023.

MATTHEWS, D. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412 - 419, 1985.

MAZZA, R. P. J.; SANTANA, M. L. P.; OLIVEIRA, L. P. M. Doença Hepática Crônica. In: CUPPARI, L. (Coord.). **Nutrição: nas doenças crônicas não-transmissíveis**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 331 - 433.

MBUMA, N. W.; GERRANO, A. S.; LEBAKA, N.; LABUSCHAGNE, M. Interrelationship between grain yield components and nutritional quality traits in cowpea genotypes. **South African Journal of Botany**, v. 150, p. 34 - 43, 2022.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Eds.). **Química de Alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. p. 175 - 238.

MEHTA, N.; RAO, P.; SAINI, R. A review on metabolites and pharmaceutical potential of food legume crop mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Biotechnologia**, v. 102, n. 4, p. 425 - 435, 2021.

MEKONNEN, T. W.; GERRANO, A.S.; MBUMA, N. W.; Labuschagne, M. T. Breeding of Vegetable Cowpea for Nutrition and Climate Resilience in Sub-Saharan Africa: Progress, Opportunities, and Challenges. **Plants**, v. 11, n. 12, 2022.

MILLER, D. D. Minerais. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Eds.). **Química de Alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. p. 623 - 676.

MONK, J. M. et al. Navy bean supplementation in established high-fat diet-induced obesity attenuates the severity of the obese inflammatory phenotype. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 1 - 20, 2021.

MOREIRA, L. P. D. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) Flour and Oil Ameliorate Metabolic Disorders in the Liver of Rats Fed a High-Fat and High Fructose Diet. **Foods**, v. 11, n. 3, 2022.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. D. R. et al. Identification and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity in cowpeas of BRS Xiquexique cultivar. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 1, p. 209–216, 2018.

MULLINS, A. P.; ARJMANDI, B. H. Health benefits of plant-based nutrition: Focus on beans in cardiometabolic diseases. **Nutrients**, v. 13, n. 2, 2021.

MUNE, M. A. M.; MINKA, S. R. Production and characterization of cowpea protein hydrolysate with optimum nitrogen solubility by enzymatic hydrolysis using pepsin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2561–2568, 2017.

MYERS, J. R. et al. Improving the health benefits of snap bean: Genome-wide association studies of total phenolic content. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 2019.

NEMETH, E. et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090 - 2093, 2004.

NEMETH, E.; GANZ, T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021.

NEMLI, E. et al. Interactions between proteins and phenolics: effects of food processing on the content and digestibility of phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 104, n. 5, p. 2535 - 2550, 2024.

NGUYEN, A. T. et al. Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Lower Non-HDL Cholesterol in Hamsters Fed a Diet Rich in Saturated Fat and Act on Genes Involved in Cholesterol Homeostasis. **Journal of Nutrition**, v. 149, n. 6, p. 996–1003, 2019.

NOSWORTHY, M. G.; MEDINA, G.; LU, Z. -H.; HOUSE, J. D. **Assessment and the Human Health Benefits of Pulses**. **Foods**, v.12, n.15, 2023.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 2007.

NURMOMADE, S.; BASU, S.; CARVALHO, I.; EDUARDO, M.; ANDERSSON, R. Effect of pre-treatment on physicochemical, microstructural and pasting properties of pearl millet and cowpea. **LWT- Food Science and Technology**, v. 198, n. 2, 2024.

NUTTI, M. R. A história dos projetos HarvestPlus, AgroSalud E Bio. REUNIÃO DE BIOFORTIFICAÇÃO. 4., 2011. **Reunião [...]** Teresina: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54482/1/2011-133.pdf>>.
Acesso em: 30/01/2024.

OBAFEMI, T. O.; OLALEYE, M. T.; AKINMOLADUN, A. C. Antidiabetic property of miracle fruit plant (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell) leaf extracts in fructose-fed streptozotocin-injected rats via anti-inflammatory activity and inhibition of carbohydrate metabolizing enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, n. 15, 2019.

OFORI, K. F.; ANTONIELLO, S.; ENGLISH, M. M.; ARYEE, A. N.A. Improving nutrition through biofortification—A systematic review. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

OJO, B. A. et al. Pinto beans modulate the gut microbiome, augment MHC II protein, and antimicrobial peptide gene expression in mice fed a normal or western-style diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 88, 2021.

ONG, T. P.; MORENO, F. S. Perspectivas de aplicação da biologia molecular na área de nutrição: Nutrigenômica. In: CUPPARI, L. (Ed.). **Nutrição nas doenças crônicas não-transmissíveis**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 473–503.

PAFILI, K.; RODEN, M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. **Molecular Metabolism**, v. 50, 2021.

PELIZARO, C. B.; NOGUEIRA, A.R.A.; CARAPELLI, R. Determinação de Ferro em sangue, soro e plasma por espectrometria de absorção atômica com chama. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 14., 2007, João Pessoa. **Anais [...]** João Pessoa: Embrapa, 2007.

PEREIRA, H. S. et al. **Biofortificação feijão-comum**. 1. ed. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 2020.

PERERA, O. S. et al. Modulating effects of cowpea incorporated diets on serum lipids and serum antioxidant activity in Wistar rats. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 44, n. 1, p. 69–76, 2016.

PÉREZ-RAMÍREZ, I. F. et al. Effect of different pigmented cooked common beans on glucose and lipid metabolism in obese rats and 3T3 L1 cells. **Food Bioscience**, v. 53, 2023.

PIRES, L. V.; PEDROSA, L. F. C.; ALENCAR, L.L.; BORTOLI, M.C.; COZZOLINO FRANCISCATO, S.M. F. Minerais e diabetes melito. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.

PISKIN, E.; CIANCIOSI, D.; GULEC, S.; TOMAS, M.; CAPANOGLU, E. Iron Absorption: Factors, Limitations, and Improvement Methods. **ACS Omega**, v. 7, n. 24, p. 20441 - 20456, 2022.

PRASAD, K. N.; BONDY, S. C. Dietary fibers and their fermented short-chain fatty acids in prevention of human diseases. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 17, n. 100170, 2019.

PRASADI, V. P. N. et al. Effect of hermetic storage on the development of hard-to-cook characteristics and nutritional properties of mungbean (*Vigna radiata* (L.) R.

Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Journal of Stored Products Research**, v. 104, 2023.

RAHMAN, S.; SHAHEEN, N. Phytate-iron molar ratio and bioavailability of iron in Bangladesh. **Tropical Medicine and International Health**, v. 27, n. 5, p. 509–514, 2022.

RAMOS, L. P. A. et al. Antioxidant compounds from *Annona crassiflora* fruit peel reduce lipid levels and oxidative damage and maintain the glutathione defense in hepatic tissue of Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 142, 2021.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

RIBEIRO, P. V. DE M. et al. Dietary non-nutrients in the prevention of non-communicable diseases: Potentially related mechanisms. **Nutrition**, v. 66, p. 22–28, 2019.

ROCHA, D. M. U. P.; LOPES, L. L.; HERMSDORFF, H. H. M. Alimentos Funcionais e Síndrome Metabólica. Em: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. DE O. B. (Eds.). **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. p. 331–345.

RODEN, M.; SHULMAN, G. I. The integrative biology of type 2 diabetes. **Nature**, v. 576, n. 7785, p. 51–60, 2019.

RODRÍGUEZ-ESPAÑA, M.; FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C. Y.; FIGUEROA-CÁRDENAS, J. D.; RAYAS-DUARTE, P.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z. J. EFFECTS of germination and lactic acid fermentation on nutritional and rheological properties of sorghum: A graphical review. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 807–812, 2022.

ROHR, M.; BRANDENBURG, V.; BRUNNER-LA ROCCA, H. P. How to diagnose iron deficiency in chronic disease: A review of current methods and potential marker for the outcome. **European Journal of Medical Research**, v.28, n.15, 2023.

RONG, L. et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 2023.

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico).

SÁNCHEZ-TAPIA, M. et al. Consumption of cooked black beans stimulates a cluster of some clostridia class bacteria decreasing inflammatory response and improving insulin sensitivity. **Nutrients**, v. 12, n. 4, 2020.

SANT'ANA, C. T.; ANTUNES, P. T.; REIS, T. C.; VÁZ-TOSTES, M. G.; MEIRA, E. F.; COSTA, N. M. B. Bioaccessibility and bioavailability of iron in biofortified germinated

cowpea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 14, p. 6287-6295, 2019.

SANT'ANA, C. T. **Características físico-químicas, bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado germinado**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

SANTOS, A. D. C.; PASSOS, A. F. F.; SOUZA, L. B.; COELHO, A. S. G.; COMINETTI, C. Consumption of ultra- and non-ultra-processed foods of individuals with normal-weight obesity. **Journal of Nutritional Science**, v. 12, 2023.

SANTOS, C. A. S.; ROSA, C.O.B.; LEITE, J.I.A.; BRESSAN, J. Alimentos Funcionais e Dislipidemias. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C.O. B. (Org.). **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. p. 397 - 407.

SCHWARTZ, S. J.; Cooperstone, J. L.; Cichon, M. J.; Elbe, J. H.V.; Giusti, M. M. Corantes. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Eds.). **Química de alimentos Fennema**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2019. p. 677–748.

SEAL, C. J.; COURTIN, C. M.; VENEMA, K.; VRIES, J. Health benefits of whole grain: effects on dietary carbohydrate quality, the gut microbiome, and consequences of processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 3, p. 2742 - 2768, 2021.

SHEN, Y.; HONG, S.; LI, Y. Chapter Three - Pea protein composition, functionality, modification, and food applications: A review. In: WU, J. (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**. 1. ed. Zoe Kruze, 2022. v. 101, p. 71 - 127.

SHEORAN, S. et al. Current Status and Potential of Biofortification to Enhance Crop Nutritional Quality: An Overview. **Sustainability**, v. 14, n. 6, 2022.

SIEGFRIED, R. et al. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirt Forsch**, v. 37, p. 298–304, 1984.

SILVA, L. M. **Composição nutricional e índice glicêmico de feijões caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) alvos para a biofortificação**. 2022. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2022.

SILVEIRA, A. C.; KASSUIA, Y. S.; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO, M. **Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível**. Colombo: Embrapa Florestas, 2018. 11 p. (Comunicado Técnico).

SIMAS, L.A.C.; MARTINS, J.O.; PENTEADO, S.H.N.W.; ALVES, M.F.M.; KALINICZENKO, A. Prevalência da anemia ferropriva na primeira infância. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 43, n. 1, p. S298, 2021.

- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1999, p. 152 - 178.
- SOLIMAN, A. T.; SANCTIS, V.; YASSIN, M.; SOLIMAN, N. Iron deficiency anemia and glucose metabolism. **Acta Biomedica**, v. 88, n.1, p. 112-118, 2017.
- SOMBIÉ, P. A. E. D. et al. Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) genotypes from Burkina Faso. **Foods**, v. 7, n. 9, 2018.
- STOFFEL, N. U. et al. The effect of central obesity on inflammation, hepcidin, and iron metabolism in young women. **International Journal of Obesity**, v. 44, n. 6, p. 1291–1300, 2020.
- SWIATEK, M. et al. The potential for the use of leghemoglobin and plant ferritin as sources of iron. **Open Life Sciences**, v. 18, n. 1, 2023.
- TAHAPARY, D. L. et al. Challenges in the diagnosis of insulin resistance: Focusing on the role of HOMA-IR and Tryglyceride/glucose index. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 16, n. 8, 2022.
- TAN, Y. et al. Cooked black turtle beans ameliorate insulin resistance and restore gut microbiota in C57BL/6J mice on high-fat diets. **Foods**, v. 10, n. 8, 2021.
- TAN, Y.; CHANG, S. K. C.; ZHANG, Y. Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. **Food Chemistry**, v. 214, p. 259 - 268, 2017.
- TEIXEIRA-GUEDES, C.; Sánchez-Moya, T.; Pereira-Wilson, C.; Ros-Berruezo, G.; López-Nicolás, R. In Vitro Modulation of Gut Microbiota and Metabolism by Cooked Cowpea and Black Bean. **Foods**, v. 9, n. 7, 2020.
- THANARAJAH, S. E. et al. Habitual daily intake of a sweet and fatty snack modulates reward processing in humans. **Cell Metabolism: Clinical and Translational Report**, v. 35, n. 4, p. 571 - 584, 2023.
- THANNOUN, A. M.; Mahoney, A.W.; Hendricks, D.G.; Zhang, D. Effect of meat-bread mixture on bioavailability on total dietary iron for anemic rats. **Cereal chemistry**, v. 64, n. 6, p. 399 - 403, 1987.
- TUNG MUNNITHUM, D.; Drouet, S.; Lorenzo, J. M.; Hano, C. Characterization of bioactive phenolics and antioxidant capacity of edible bean extracts of 50 fabaceae populations grown in Thailand. **Foods**, v. 10, n. 12, 2021.
- TZANOVA, M. T. et al. Antioxidant Potentials of Different Genotypes of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Cultivated in Bulgaria, Southern Europe. **Agronomy**, v. 13, n. 7, 2023.
- UNGER, G.; Benozzi, S. F.; Perruzza, F. Pennacchiotti, G. L. Índice triglicéridos y glucosa: Un indicador útil de insulinoresistencia. **Endocrinología y Nutrición**, v. 61, n. 10, p. 533 - 540, 2014.

VASSILIOU, E.; FARIAS-PEREIRA, R. Impact of Lipid Metabolism on Macrophage Polarization: Implications for Inflammation and Tumor Immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, 2023.

VEREDIANO, T. A. et al. Black corn (*Zea mays* L.) flour has the potential to improve the gut microbiota composition and goblet cell proliferation in mice fed a high-fat diet. **Nutrition Research**, v. 108, p. 60–72, 2022.

VIEIRA, N. M. et al. Beans consumption can contribute to the prevention of cardiovascular disease. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 54, p. 73-80, 2023.

WANG, S. et al. Regular intake of white kidney beans extract (*Phaseolus vulgaris* L.) induces weight loss compared to placebo in obese human subjects. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1315–1324, 2020.

WHO – World Health Organization. WHO calls for accelerated action to reduce anaemia. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/12-05-2023-who-calls-for-accelerated-action-to-reduce-anaemia>>. Acesso em: 01/02/2024a.

WHO – World Health Organization. Anaemia. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/anaemia#tab=tab_1>. Acesso em: 23/04/2023a.

WINHAM, D. M. et al. Black Bean Pasta Meals with Varying Protein Concentrations Reduce Postprandial Glycemia and Insulinemia Similarly Compared to White Bread Control in Adults. **Foods**, v. 11, n. 11, 2022.

YANG, Z.; HAO, H.; WU, Y.; LIU, Y.; OUYANG, J. Influence of moisture and amylose on the physicochemical properties of rice starch during heat treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 656–662, 2021.

YUSTISIA, I.; TANDIARI, D.; CANGARA, M. H.; HAMID, F. DAUD, N. AS. A high-fat, high-fructose diet induced hepatic steatosis, renal lesions, dyslipidemia, and hyperuricemia in non-obese rats. **Heliyon**, v. 8, n. 10, 2022.

ZARIC, B. L.; MACVANIN, M. T.; ISENOVIC, E. R. Free radicals: Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic applications. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 106346, 2023.

ZHAO, Q. et al. Adzuki bean alleviates obesity and insulin resistance induced by a high-fat diet and modulates gut microbiota in mice. **Nutrients**, v. 13, n. 9, 2021.

ZHAO, Y.; Du, S. K.; Wang, H.; Cai, M. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chemistry**, v. 152, p. 462 - 466, 2014.

ZHU, X. et al. Pulse Protein Isolates as Competitive Food Ingredients: Origin, Composition, Functionalities, and the State-of-the-Art Manufacturing. **Foods**, v. 13, n. 6, 2024.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



Universidade Federal
do Espírito Santo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"Biodisponibilidade de Ferro"***, que visa o atendimento das aulas práticas das disciplinas "PCTA 1140 - Biodisponibilidade de Nutrientes - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos" e "DFN 05474 - Nutrição Experimental - Curso de Graduação em Nutrição", registrada sob o n.º **013/2022**, sob a responsabilidade de **Neuza Maria Brunoro Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CAMPUS DE ALEGRE (CEUA-ALEGRE) do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes).

Vigência da autorização: 28/09/2022 a 28/08/2027

Finalidade: Ensino

Espécie(s): Ratos (*Ratus norvegicus*) Wistar

Peso: Variável

Idade: Recém-desmamados

Sexo: Machos

Número de animais: 48

Origem: Biotério Central do CCS da UFES, Campus de Maruípe, Vitória, ES.

Alegre-ES, 28/09/2022

Mashal Costa Leme - Coordenador da CEUA-ALEGRE

Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Alegre – CEUA-ALEGRE
Alto Universitário, s/n – Guararema – Alegre, ES, Brasil – CEP 29500-000 - Telefone: 028 3552 8900 – ceua.aligre@gmail.com – www.aligre.ufes.br

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.