



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

**CÍNTIA TOMAZ SANT' ANA**

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DO FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO GERMINADO**

ALEGRE - ES  
AGOSTO – 2018

CÍNTIA TOMAZ SANT'ANA

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DO FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO GERMINADO**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Maria Brunoro Costa

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Vaz Tostes

ALEGRE - ES

AGOSTO – 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S231c Sant' Ana, Cíntia Tomaz, 1993-  
Características físico-química, bioacessibilidade e  
biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado germinado /  
Cíntia Tomaz Sant' Ana. – 2018.  
67 f. : il.

Orientador: Neuza Maria Brunoro Costa.

Coorientador: Maria das Graças Vaz Tostes.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias.

1. Biodisponibilidade. 2. Germinação. 3. Feijão. 4. Nutrientes. I.  
Costa, Neuza Maria Brunoro. II. Tostes, Maria das Graças Vaz. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias. IV. Título.

CDU: 664

---

Bibliotecário: Felício Gomes Corteletti – CRB-6 ES-000646/O

CÍNTIA TOMAZ SANT'ANA

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, BIOACESSIBILIDADE E  
BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DO FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO  
GERMINADO**

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 02 de agosto de 2018.



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neuza Maria Brunoro Costa  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria das Graças Vaz Tostes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientadora



---

Dr.<sup>a</sup> Priscila Brigide  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinadora



---

Prof. Dr. Eduardo Frizzera Meira  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Vânia Tomaz e José Sant' Ana, por todo apoio, incentivo e amor incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser minha luz, e por sempre mostrar sua presença na minha vida, permitindo alcançar mais essa conquista.

Aos meus pais, Vânia Maria Silveira Tomaz e José Augusto Sant' Ana, por sonhar meus sonhos e por pensar sempre em mim em primeiro lugar, deixando de lado seus sonhos para que o meu se realize. Obrigado por nunca me deixarem pensar pequeno e por sempre me fazerem sonhar alto e correr atrás da realização dos meus sonhos, mesmo que o caminho parecesse impossível. Obrigado por ser meu exemplo de pessoas incríveis e honestas e por serem os melhores pais do mundo.

Aos meus irmãos, Bruna Tomaz Sant' Ana e Pedro Augusto Silveira Sant' Ana, por todo carinho e amor, por se alegrarem por cada conquista minha.

A minha orientadora, Neuza Maria Brunoro Costa, por todos os ensinamentos e aprendizados. Por transmitir sua paixão pela pesquisa e fazer com que eu me fascine por esse mundo e tenha mais amor pela profissão de Nutricionista. Obrigado pelo exemplo espetacular de pessoa e profissional.

A minha coorientadora, Maria das Graças Vaz Tostes pela disponibilidade em sempre poder contribuir para a realização deste trabalho, e contribuir para meu aprendizado.

A Paula Tavares Antunes, por todos os momentos, desde o início do Mestrado, por fazer as horas infinitas de laboratório se tornar mais divertidas, por todos os conhecimentos, descobertas, obstáculos, correria e dúvidas que passamos juntas.

Ao técnico do Laboratório de Nutrição Experimental, Eduardo Lorencetti Fornazier, por toda companhia, risadas e histórias. Por fazer mais que seu trabalho e sempre ajudar quando precisava.

Às estagiárias, Tuane Carrari, Renata Araújo e Renata Figliuzzi pela disponibilidade durante todo o experimento.

A todos os meus amigos, em especial a Natássia Guimarães, Wallaf Vimercati, Priscila Vargas e Raquel Lima, que compartilharam comigo momentos

únicos, que transformaram o desespero em momentos e histórias inesquecíveis.

Ao Professor Eduardo Frizzera Meira, do Departamento de Farmácia, pela imensa ajuda, dedicação e paciência nas análises de proteínas do metabolismo do ferro.

Ao Laboratório de Solos do Departamento de Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (UFES- Alegre) pela disponibilidade nas análises de minerais.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

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

O meu sincero agradecimento a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização desta pesquisa e realização de um sonho.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais das fases de Depleção e Repleção (g/1000 g de dieta). .....	21
Tabela 2. Composição centesimal do feijão-caupi convencional (BRS Nova Era) e biofortificado (BRS Tumucumaque) submetidos ao cozimento e germinação. ....	25
Tabela 3. Fatores antinutricionais presentes no feijão-caupi convencional (BRS Nova Era) e biofortificado (BRS Tumucumaque). .....	27
Tabela 4. Razão molar fitato:ferro dos feijões. ....	29
Tabela 5. Bioacessibilidade de ferro dos feijões.....	30
Tabela 6. Consumo Alimentar (CA), Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), Teor de ferro da dieta e Consumo de Ferro (Cons Fe) na fase de depleção. ....	33
Tabela 7. Hemoglobina (Hb) dos grupos experimentais ao final das fases de depleção e repleção e ganho de hemoglobina.....	34
Tabela 8. Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE) e Valor Biológico Relativo (RBV) dos grupos experimentais.....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proteínas envolvidas na absorção do ferro .....	9
Figura 2. Feijão-caupi cru .....	13
Figura 3. Desenho experimental do estudo.....	14
Figura 4. Ganho de peso (g) dos grupos experimentais .....	32
Figura 5. Hepcidina sérica dos grupos experimentais .....	36

## LISTA DE ANEXO

Anexo A. Parecer do Comitê de Ética .....	51
---	----

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Feijão .....	4
3.1.1 Feijão-Caupi.....	4
3.1.2 Composição química e importância nutricional .....	5
3.1.3 Fatores antinutricionais presentes no feijão .....	6
3.2 Germinação .....	7
3.3 Metabolismo do Ferro .....	9
3.3.1 Anemia Ferropriva .....	10
3.4 Biofortificação de alimentos .....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4.1 Matéria-Prima .....	13
4.2 Desenho experimental.....	14
4.3 Germinação do feijão convencional e biofortificado.....	14
4.4 Cozimento do feijão convencional e biofortificado .....	15
4.5 Obtenção da farinha dos feijões .....	15
4.6 Caracterização físico-química.....	15
4.6.1 Composição centesimal .....	15
4.6.2 Determinação de Ferro .....	16

4.6.3 Fatores antinutricionais .....	16
4.6.3.1 Determinação de taninos .....	16
4.6.3.2 Determinação de fitatos .....	17
4.6.3.3 Determinação de compostos fenólicos totais .....	18
4.6.4 Determinação da Razão molar fitato:ferro .....	18
4.7 Estudo <i>in vitro</i> .....	18
4.7.1 Bioacessibilidade do ferro .....	18
4.8 Ensaio biológico .....	19
4.8.1 Ética .....	19
4.8.2 Delineamento Experimental .....	19
4.8.3 Dietas Experimentais .....	20
4.8.4 Determinação dos parâmetros hematológicos .....	21
4.8.4.1 Dosagem sérica de Hepsidina .....	22
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
6.1 Composição centesimal .....	25
6.2 Fatores antinutricionais .....	27
6.3 Estudo <i>in vitro</i> .....	30
6.3.1 Bioacessibilidade do ferro dos feijões .....	30
6.4 Ensaio Biológico .....	32
6.4.1 Ganho de peso e Consumo alimentar .....	32
6.4.2 Biodisponibilidade de ferro dos feijões .....	33
6.4.3 Hepsidina sérica .....	36
7 CONCLUSÃO .....	38
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética .....	51

## RESUMO

SANT' ANA, Cíntia Tomaz. **Características físico-químicas, bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado germinado**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa. Coorientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Vaz Tostes.

O feijão fornece nutrientes essenciais, sendo considerado a melhor fonte de ferro entre os alimentos de origem vegetal. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. *Walph*) é consumido predominantemente no Norte e Nordeste do Brasil, e sua biofortificação com ferro visa reduzir as altas prevalências de anemia ferropriva nessas regiões. Alguns fatores antinutricionais presentes no feijão, estão relacionados com a capacidade de formar complexos insolúveis com minerais, ocasionando assim a redução de sua biodisponibilidade. Prioriza-se seu consumo na forma cozido, porém, na forma germinada pode melhorar a qualidade nutricional, levando a diminuição de alguns fatores antinutricionais e, conseqüentemente a maior biodisponibilidade de minerais. O objetivo do estudo foi verificar as características físico-químicas, bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado germinado. Foi utilizado como matéria prima o feijão-caupi BRS Tumucumaque (biofortificado) e BRS Nova Era (convencional). Realizou-se a germinação e cozimento dos feijões e a caracterização físico-química (umidade, cinza, lipídeo, proteína, carboidrato, fibra, ferro, tanino, fitato, fenólicos totais) e cálculo da razão molar fitato-ferro. A bioacessibilidade de ferro foi determinada por meio de digestão *in vitro*. A biodisponibilidade foi avaliada pela metodologia de depleção/repleção utilizando ratos *wistar* com cinco grupos experimentais: sulfato ferroso (SF), Tumucumaque cozido (TC), Tumucumaque germinado (TG), Nova Era cozido (NC), Nova Era germinado (NG). Foi analisado o ganho de hemoglobina, Eficiência de regeneração de hemoglobina (HRE), Valor biológico relativo (RBV) e hepcidina sérica. Não houve diferença estatística ente o feijão germinado e cozido em relação à composição centesimal. O feijão biofortificado apresentou menor teor de lipídios e maiores de cinza e proteína ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao convencional. O cultivar biofortificado apresentou teor de ferro de 69,42 mg/kg para o cozido e 69,74 mg/kg para o germinado, e o convencional 47,15 mg/kg e 47,19 mg/kg para cozido e germinado, respectivamente, sem diferença estatística em relação ao cozimento e germinação. Os feijões germinados apresentaram teores de fitatos e taninos semelhantes ao cozimento. A razão molar fitato-ferro para todos os grupos não apresentaram diferença estatística. A bioacessibilidade *in vitro* de ferro dos feijões germinados apresentaram valores superiores ( $p \leq 0,05$ ), em comparação com o cozimento. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos parâmetros avaliando a biodisponibilidade de ferro *in vivo*. Os níveis séricos de hepcidina mantiveram valores semelhantes entre os grupos. A germinação demonstrou maior bioacessibilidade de ferro. A biodisponibilidade de ferro dos feijões biofortificados que foram germinados foi comparável ao sulfato ferroso. O processo de germinação do feijão pode ser considerado um método eficiente de consumo dessa leguminosa, apresentando boa bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro.

**Palavras-chave:** biodisponibilidade, bioacessibilidade, germinação, feijão, biofortificação, antinutricionais.

## ABSTRACT

SANT' ANA, Cíntia Tomaz. **Physicochemical characteristics, bioaccessibility and bioavailability of iron from biofortified germinated cowpea.** 2018. Dissertation (Master in Science and Food Technology) - Federal University of Espírito Santo, Alegre - ES. Advisor: Profa Dr. Neuza Maria Brunoro Costa. Co-advisor: Profa Dr. Maria das Graças Vaz Tostes.

Beans provide essential nutrients, being considered the best source of iron among those of vegetable origin. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. *Walph*) is consumed predominantly in the North and Northeast of Brazil, and its biofortification with iron aims to reduce the high prevalence of iron deficiency anemia in these regions. Some antinutritional factors present in the beans are related to the ability to form insoluble complexes with minerals, thus reducing their bioavailability. It is prioritized its consumption in the cooked form, however, in the germinated form can improve the nutritional quality, leading to the decrease of some antinutritional factors and, consequently, the greater bioavailability of minerals. The objective of this study was to verify the physico-chemical characteristics, bioaccessibility and bioavailability of iron from biofortified germinated cowpea. BRS Tumucumaque (biofortified) and BRS Nova Era (conventional) were used as raw material. The germination and cooking of the beans and the physicochemical characterization (moisture, ash, lipid, protein, carbohydrate, fiber, iron, tannin, phytate, total phenolics) and phytate-iron molar ratio calculation were performed. Bioaccessibility of iron was determined by *in vitro* digestion. The bioavailability was evaluated by the depletion/repletion methodology by the *in vivo* experiment using Wistar rats with five experimental groups: ferrous sulfate (SF), cooked Tumucumaque (TC), germinated Tumucumaque (TG), cooked Nova Era (NC), germinated Nova Era (NG). Hemoglobin gain, hemoglobin regeneration efficiency (HRE), relative biological value (RBV) and serum hepcidin were analyzed. There was no statistical difference between the germinated and cooked beans in relation to the centesimal composition. The biofortified beans had lower lipids and higher values of ash and protein ( $p \leq 0.05$ ) than the conventional one. The biofortified cultivar had 69.42 mg/kg iron content for the cooked and 69.74 mg/kg for the germinated beans, and the conventional cultivar values were 47.15 mg/kg and 47.1 mg/kg for cooked and germinated beans, respectively, without statistical difference in relation to cooking and germination. The germinated beans showed levels of phytates and tannins similar to cooking. The phytate-iron molar ratio for all groups did not show statistical difference. The *in vitro* bioaccessibility of iron of the germinated beans had higher values ( $p \leq 0.05$ ) compared to cooking. There was no statistical difference between the groups regarding the parameters evaluating the bioavailability of *in vivo* iron. Serum hepcidin levels remained similar between groups. Germination showed greater bioaccessibility of iron. Germination was efficient to release iron from the food matrix. The bioavailability of iron from the biofortified germinated beans was comparable to that of ferrous sulfate. The germination process of the bean can be considered an efficient method of consumption of this legume, presenting good bioaccessibility and bioavailability of iron.

**Keywords:** bioavailability, bioaccessibility, germination, bean, biofortification, antinutritional.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão tradicionalmente faz parte da alimentação da população brasileira, fornecendo nutrientes essenciais como proteínas, vitaminas, carboidratos, fibras e minerais como ferro, zinco, cálcio e manganês (MONTOYA et al., 2010; NAKITTO et al., 2015; NKUNDABOMBI et al., 2016). Entre os alimentos de origem vegetal, é considerado a melhor fonte de ferro e proteínas, apresentando, portanto, uma alternativa de destaque para melhorar a qualidade nutricional da alimentação de populações (BELANE; DAKORA, 2011; MARTINEZ et al., 2011).

Dentre os feijões, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. *Walph*), conhecido também como feijão-de-corda, feijão-macassar ou feijão fradinho, que devido a questões climáticas, ou seja, altas temperaturas e alta umidade ou altas temperaturas e semiaridez, predomina-se o cultivo e consumo no Norte e Nordeste do Brasil (FREIRE FILHO et al., 2011).

Alguns fatores antinutricionais estão presentes no feijão, reduzindo a digestibilidade desta leguminosa, como o ácido fítico e taninos (BENEVIDES et al., 2011; MARTINEZ et al., 2011). As características antinutricionais desses compostos estão relacionadas com a capacidade de formar complexos insolúveis com proteínas e minerais, ocasionando assim a redução de sua biodisponibilidade (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008; VALDÉS, 2010).

O consumo humano de sementes germinadas, os denominados “brotos”, como feijão, soja, lentilha, ervilha, entre outros, é bem difundido e apreciado em países como China, Japão e Estados Unidos, por fazerem parte da tradição de consumo dessas populações. No Brasil prioriza-se o consumo do feijão cozido, porém, observa-se o crescimento da demanda pelo consumo do feijão germinado (SÁNCHEZ et al., 2016; FORDHAM et al., 1975).

Apesar do feijão ser consumido pela maioria das populações na forma cozida, o consumo nas formas germinado, descascado e macerado são alternativas aplicadas para este se tornar mais facilmente digerível e melhorar sua qualidade nutricional, levando a diminuição de alguns fatores antinutricionais e, conseqüentemente a maior biodisponibilidade de vitaminas e minerais (KOEHLER et al., 2007; MOONGNGARM et al., 2010; MARTINEZ, 2011; HUNG et al., 2012; WEI

et al., 2013; BRIGIDE et al., 2014; DUEÑAS et al., 2016). Além disso, o processo de germinação é uma alternativa econômica e bem simples (MARTINEZ, 2011; WONGSIRI et al., 2015).

Estudos demonstram um aumento significativo no teor de ferro em alimentos que passaram pelo processo de germinação (SILVA, 2011; WEI et al., 2013). De acordo com Mubarak (2005), a germinação do feijão aumentou significativamente o teor de proteína, variando de 26,80% para 30,00%, assim como diminuição do conteúdo de fatores antinutricionais, apresentando um percentual de redução de ácido fítico de 30,5%.

Outros métodos para melhorar a qualidade nutricional de alimentos estão sendo amplamente estudados. Entre estes destaca-se a biofortificação, que é realizada por meio do melhoramento genético, apresentando como foco micronutrientes como ferro, vitamina A e zinco, que são reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde como de grande impacto na saúde de populações quando em consumo inadequado (BRASIL, 2007; BOUIS et al., 2011; NESTEL et al., 2011). O feijão torna-se um alimento com potencial positivo para o processo de biofortificação por ter um amplo alcance social, devido ser a base da alimentação da população brasileira e de grande aceitação (CARVALHO et al., 2012; MINGUITA et al., 2012).

A biofortificação do feijão-caupi com ferro visa reduzir a prevalência de anemia ferropriva nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Por meio desse processo, o teor de ferro chega a alcançar em média de 77 mg de ferro por quilo, enquanto o convencional apresenta 50 mg de ferro por quilo do produto (BIOFORT, 2018a).

Desde modo, a investigação do processo de germinação do feijão biofortificado como alternativa de melhorar a biodisponibilidade de ferro torna-se importante, uma vez que poderá trazer benefícios para a população acometida por carências relacionadas à má nutrição.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar as características físico-químicas, bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) biofortificado germinado.

### **2.2 Objetivos específicos**

- I. Determinar o teor de ferro do feijão-caupi biofortificado e convencional submetidos à germinação e cozimento.
- II. Comparar as características físico-químicas do feijão-caupi biofortificado e convencional submetidos à germinação e cozimento;
- III. Verificar a influência da germinação em relação aos fatores antinutricionais presentes no feijão-caupi biofortificado e comparar com o processo de cozimento;
- IV. Avaliar a bioacessibilidade de ferro dos feijões por método *in vitro*;
- V. Avaliar a eficiência do processo de germinação em relação à biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado por meio de estudo *in vivo*.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Feijão**

O feijão é um alimento em destaque na cultura e na culinária nacional, com presença constante ou até mesmo diária na mesa de grande parte da população brasileira (RIOS et al., 2003). A inserção na alimentação humana evidencia sua presença na época da Grécia antiga e do Império Romano, onde foi disseminado em guerras e nas grandes explorações, sendo utilizado na alimentação e como forma de contagem de votos. Era ainda encontrado em tumbas egípcias, como símbolo de culto à vida (CARNEIRO et al., 2005; RIOS et al., 2003).

No Brasil, o feijão veio a se firmar nos hábitos alimentares a partir do processo de interiorização do país graças aos bandeirantes paulistas e sertanejos nordestinos, pois este era um alimento de fácil armazenamento e de crescimento muito rápido, se tornando um alimento de subsistência destes viajantes (LAJOLO et al., 1996).

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção de feijão, sendo o maior produtor mundial, com produção de 3.363,0 mil toneladas e 3.120,0 mil hectares de área plantada, sendo dessa área 315,5 mil hectares de feijão preto, 1.416 mil hectares de feijão de cores e 1388,2 mil hectares de feijão-caupi (CONAB, 2018). O Brasil, assim como outros países como México, Nicarágua, El Salvador, Cuba, Burundi, Ruanda, Quênia, Uganda, Índia e Coreia do Norte, além de produtores, também são importantes consumidores desta leguminosa (EMBRAPA, 2018c).

#### **3.1.1 Feijão-caupi**

O feijão-caupi é uma cultura de origem africana, a qual foi introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no Estado da Bahia, e a partir desta foi disseminado por todo o país (VIEIRA et al., 2006).

O feijão-caupi tem vários nomes populares, entre estes 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, feijão-fradinho nos estados de Sergipe, Bahia e Rio de Janeiro (FREIRE FILHO et al., 2011).

A produção de feijão-caupi concentra-se nas regiões Nordeste e Norte, regiões estas de áreas semiáridas em razão das irregularidades de chuvas e altas temperaturas. Estas características fazem com que outras culturas de leguminosas não se desenvolvam satisfatoriamente (RODRIGUES et al., 2015). A produção dessa variedade nas regiões Nordeste e Norte é feita por empresários e agricultores familiares que ainda utilizam práticas tradicionais (BEZERRA et al., 2014).

O feijão-caupi, pela plasticidade, adaptação a uma ampla faixa de ambientes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, alto valor nutritivo, por ser um alimento básico em vários países e ainda diante das perspectivas de mudanças climáticas e da necessidade de alimento em todo o mundo, é uma cultura de grande potencial atual e estratégico (XIONG et al., 2016).

### **3.1.2 Composição química e importância nutricional**

Os grãos do feijão apresentam em média 20 a 25% de proteína, 60 a 65% de carboidratos, 1 a 3% de lipídeos e 1 a 20% de fibras alimentares. Possuem ainda vitaminas como tiamina, niacina, riboflavina, ácido fólico e vitamina B6 e minerais como ferro, cobre, zinco, fósforo, potássio e magnésio (NKUNDABOMBI et al., 2016; NAKITTO et al., 2015; MONTOYA et al., 2010).

Do ponto de vista nutricional, seu alto teor de proteínas, com quantidades elevadas de lisina, complementa esse aminoácido que é limitante nos cereais como, por exemplo, arroz e milho, fazendo com que esta mistura apresente um perfil de proteínas de origem vegetal de alto valor biológico (BELANE; DAKORA, 2011; MARTINEZ et al., 2011).

Diversos fatores determinaram a qualidade e a concentração dos nutrientes no feijão, como as condições ambientais e climáticas, formas de plantio, espécie, tempo e condições de armazenamento e forma de preparo (MARQUEZI, 2013; GLAHN et al., 2016).

Estudos demonstram importantes benefícios à saúde associados ao consumo de feijões, entre eles diabetes Melitus, obesidade, redução do colesterol, entre outros (YAO et al., 2013; OOMAH et al., 2010).

### **3.1.3 Fatores antinutricionais presentes no feijão**

Compostos presentes nos feijões que podem interferir de forma negativa no valor nutricional deste alimento são denominados fatores antinutricionais. Dentre estes, o fitato, tanino, compostos fenólicos, lectinas, alguns oligossacarídeos e inibidores de proteases (DELFINO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; OOMAH et al., 2010).

Entre os efeitos indesejáveis se encontram a diminuição da biodisponibilidade de minerais, a digestibilidade proteica e também causar flatulência. E estes efeitos estão relacionados à quantidade desses compostos presentes no alimento (BENEVIDES et al., 2011; ALMEIDA et al., 2008).

Os fitatos estão presentes naturalmente nos grãos e leguminosas e são formados no processo de maturação, constituindo uma complexa classe de compostos. São comumente denominados como ácido fítico, ácido hexafosfórico mio-inositol ou ainda 1,2,3,4,5,6 hexaquis (diidrogênio fosfato) mioinositol (BONETT et al., 2007). Sua função fisiológica na planta destaca-se no estoque de fósforo, desempenhando uma reserva energética da planta, e atua na manutenção da planta no período de dormência (AKOND et al.; 2011).

Uma das características do fitato é a sua capacidade de ligar-se a proteínas e íons metálicos e com isso formar complexos insolúveis com ferro, cálcio, zinco, cobre e manganês, podendo prejudicar a absorção destes minerais, interferindo negativamente na sua biodisponibilidade (ISRAR et al., 2013; LEAL et al., 2010; DAVIDSSON et al., 2001; TROESCH et al., 2009).

Os taninos são denominados compostos fenólicos de alto peso molecular, solúvel em água, que contêm suficientes grupos hidroxila fenólica para realizar ligações cruzadas e estáveis com proteínas (DÍAZ et al., 2010; NOZELLA, 2006). Encontram-se preferencialmente no tegumento, com a característica de conferir cor ao feijão. Comparando o feijão branco, preto e vermelho, o que apresenta o menor teor de taninos é a variedade branca (DÍAZ et al., 2010).

Entre os efeitos desse composto, destaca-se sua ação em interferir na absorção de minerais, especialmente o ferro, levando a formação de complexos insolúveis com este nutriente e causando redução de sua absorção, e conseqüentemente menor biodisponibilidade (CAMPIOM et al., 2013, HUBER,

2012).

Apesar dos aspectos indesejáveis mencionados, estes compostos também desempenham características positivas, associando-se a benefícios a saúde, como redução do risco de determinadas doenças. Contudo, deve-se avaliar a presença destes nos alimentos, pois em casos de carências nutricionais, sua presença pode acarretar interações com nutrientes importantes (OOMAH et al., 2010; RAMIREZ-CARDENAS et al., 2008).

Alternativas podem ser aplicadas aos alimentos como forma de reduzir ou eliminar esses fatores antinutricionais, com o objetivo de evitar os aspectos indesejáveis causados por estes. Entre essas alternativas destaca-se a forma de preparo do alimento, como cocção, maceração, germinação, descascamento, entre outras (KAUR et al., 2011; BATISTA et al., 2010).

### **3.2 Germinação**

A germinação é definida como o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando a sua capacidade para originar uma plântula normal, sob condições ambientais favoráveis, ocasionando a retomada do crescimento do embrião, com posterior rompimento do tegumento pela radícula. Ou seja, havendo uma semente viável em repouso ou dormência, quando satisfeita uma série de condições externas e internas, promoverá o crescimento do embrião, o qual conduzirá à germinação. Desde modo, germinar consiste em sair do repouso e entrar em atividade metabólica (HAO et al., 2016; CÁCERES et al., 2014; KIM et al., 2012).

O processo de germinação de grãos é um dos métodos mais antigos, além de ser simples e econômico, se torna uma forma de consumo de alimentos bastante apreciada, uma vez que o consumo de alimentos germinados é bastante utilizado em países como Japão, China e Estados Unidos, enquanto no Brasil já se observa o crescimento pelo consumo e utilização dos alimentos germinados, conhecidos como brotos, como o feijão, ervilha e lentilha (HAO et al., 2016; SÁNCHEZ et al., 2016; MOSTAFA et al., 1987).

Alguns estudos demonstram que a germinação pode ser uma alternativa importante para melhorar a qualidade nutricional dos alimentos como o feijão. Porém os efeitos da germinação sobre a composição química podem variar com as condições de germinação, como temperatura, luz, umidade e tempo, assim como entre as variedades ou cultivares das sementes e os métodos analíticos utilizados (DUEÑAS et al., 2016; FIORI, 2014; MARTINEZ, 2011).

Entre os benefícios demonstra-se redução dos teores de fatores antinutricionais como o ácido fítico, inibidores de proteases, aumento de ácido ascórbico, hidrólise de oligossacarídeos rafinose e estaquiose, que estão relacionados a flatulências, leva à degradação parcial de proteínas e amido, melhorando a digestibilidade (WONGSIRI et al., 2015; BERNI; CANNIATTI-BRAZACA, 2011).

A redução dos teores de fatores antinutricionais, como o fitato, gerado pelo processo de germinação, acontece através do aumento da atividade da enzima fitase, há ativação da fitase, no qual o ácido fítico é hidrolisado, liberando  $H_3PO_4$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , e inositol, levando à redução no teor de ácido fítico (MENACHO, 2009). As formas de fitato que mais afetam a biodisponibilidade de minerais são  $IP_5$  e  $IP_6$ . A fitase reduz o fitato para a forma menos fosforilada, como  $IP_4$ ,  $IP_3$  e  $IP_2$ , que tem baixo impacto na biodisponibilidade de minerais (BONETT et al., 2007). Com a redução dos fatores antinutricionais, estudos demonstram um aumento da biodisponibilidade de minerais, como o ferro, por meio da germinação de grãos (FIORI, 2014; GHAVIDEL; PRAKASH, 2007).

Sathe et al. (1983) demonstraram que a germinação com duração de cinco dias diminuiu a quantidade de fatores antinutricionais de cereais e leguminosas, como o ácido fítico, inibidores de tripsina e quimiotripsina.

Estudo realizado avaliando o efeito de vários métodos de preparo (germinação, cocção, remolho e autoclavagem) do feijão-caupi em relação a fatores antinutricionais, demonstrou que a germinação e remolho apresentaram os melhores valores de redução de fitato, enquanto em relação aos taninos foi a germinação e cocção (OLOGHOBO; FETUGA, 1984)

### 3.3 Metabolismo do Ferro

O organismo utiliza o ferro proveniente de duas principais fontes: dietético e reciclagem de hemácias. Através da dieta, o ferro é encontrado na forma heme ou orgânica e não heme ou inorgânica. O ferro heme proveniente da quebra da hemoglobina e mioglobina presente na carne vermelha. O ferro não heme é encontrado em vegetais e grãos, estando presente na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (CAMASCHELLA, 2015; GROTTTO, 2008).

O processo de absorção do ferro se inicia no duodeno, que apresenta vilosidades que aumentam a superfície de absorção deste mineral. Nesse processo de captação do ferro várias proteínas estão envolvidas (Figura 1).

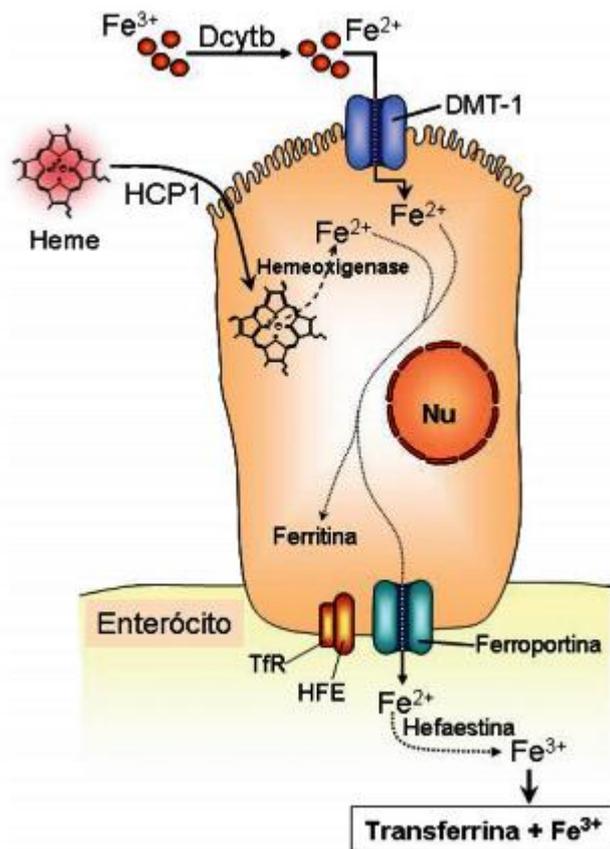


Figura 1. Proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: citocromo duodenal B; DMT-1: transportador de metal divalente1; TfR: receptor da transferrina; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; HFE: proteína de hemocromatose. Fonte: GROTTTO (2008).

Na forma heme, o ferro será transportado pelo HCP1 (heme carrier protein), e na forma não heme a proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT-1) tem a

função de transportar o ferro do lúmen para o interior do enterócito, para isso necessita que o ferro tenha sido convertido da forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Essa conversão é realizada por outra proteína, a citocromo duodemal B (DcytB) (BOGDAN et al., 2016; GROTTTO, 2010).

O ferro, no interior da célula, vai ser liberado da protoporfirina e poderá ter dois caminhos distintos, dependendo da demanda de ferro. Se a demanda do organismo for baixa, o ferro irá permanecer no enterócito, fazendo parte da ferritina, uma proteína cuja função é o estoque de ferro (CAMASCHELLA, 2015).

Se o organismo demandar ferro, será exportado da célula para o plasma pela ferroportina, para se ligar a transferrina. Assim, a expressão da ferroportina estará aumentada na deficiência de ferro e em casos de hipóxia (ABRAMOWSKI et al., 2014). O  $\text{Fe}^{2+}$  será oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  pela hefaestina para ser transportado pela transferrina (SINGH et al., 2011; LEMOS et al., 2010).

A ferroportina é também o receptor da hepcidina, que é um importante regulador da aquisição de ferro. A hepcidina possui a função de se ligar à ferroportina, regulando a exportação do ferro para o plasma. Quando as concentrações de hepcidina estão baixas, as moléculas de ferroportina são expostas na membrana plasmática e exportam ferro. Quando as concentrações de hepcidina aumentam, esta se liga às moléculas de ferroportina induzindo sua internalização e degradação, e o ferro liberado diminui progressivamente (DEICHER; HORL, 2006).

### **3.3.1 Anemia Ferropriva**

A anemia é definida pela Organização Mundial da Saúde como o estado nutricional no qual a concentração de hemoglobina está abaixo dos parâmetros da normalidade, como consequência da carência de um ou mais nutrientes essenciais, independente da origem dessa carência (BRASIL, 2013). A anemia por deficiência de ferro, conhecida como anemia ferropriva, é decorrente de longo período de balanço negativo entre a quantidade de ferro biologicamente disponível e a necessidade orgânica desse mineral (WHO, 2004; WHO, 2001).

Dentre as deficiências nutricionais presentes no mundo, a anemia ferropriva é reconhecida como uma das mais relevantes, se tornando um problema de saúde pública, especialmente pelo fato de que qualquer grupo etário é vulnerável a essa

deficiência, contudo sua prevalência destaca-se em mulheres e crianças, principalmente nos países em desenvolvimento (KASSEBAUM et al., 2014; RODRIGUES; JORGE, 2010). Estimativas apontam que 43% das crianças menores de 5 anos de idade são acometidas pela anemia (STEVENS et al., 2013).

Dentre as consequências dessa deficiência se encontram o desenvolvimento mental e psicomotor comprometido, aumento da morbimortalidade materna e infantil, além da queda no desempenho do indivíduo no trabalho e redução da resistência às infecções (LOZOFF et al., 1987;.DEMAEYER; ADIELS-TEGMAN, 1985; CASCIO et al., 2017).

A Organização Panamericana de Saúde aponta o Peru como o país com maior prevalência de anemia em toda a América Latina e Caribe (57%), seguindo o Brasil com 35% das crianças de 1 a 4 anos anêmicas, correspondendo a um total de 5 milhões nesta faixa etária (LEITÃO; OLIVEIRA, 2016). Um dos indícios para o aumento da prevalência da anemia ferropriva em crianças brasileiras decorre das mudanças nos hábitos alimentares, e que conseqüentemente acompanham a transição nutricional no Brasil (SOUZA, 2011; BATISTA FILHO et al., 2008).

Diante das graves consequências e do elevado número de casos de anemia ferropriva no Brasil, foi implantado o Programa Nacional de Suplementação Medicamentosa de ferro aos grupos de risco, como crianças de 6 a 18 meses, gestantes e mulheres no pós-parto (AMARANTE et al., 2015). Ainda, alternativas para o combate dessa deficiência são extremamente importantes, como o Ministério da Saúde tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo com ferro e ácido fólico, por serem alimentos de fácil acesso a população e não terem alterações de suas características sensoriais no processo de fortificação, além de ser economicamente viável ao país (BRASIL, 2013). Assim como a biofortificação de alimentos que vem sendo realizada com o objetivo de reduzir a carência desse mineral (BIOFORT, 2018).

### **3.4 Biofortificação de alimentos**

A biofortificação de alimentos consiste no processo de enriquecimento

nutricional de culturas, por meio do melhoramento genético convencional, ou seja, por meio de seleção e cruzamento de plantas da mesma espécie, gerando cultivares mais nutritivos. Esta difere da fortificação de alimentos, que ocorre durante o processamento, consistindo na adição de micronutrientes a alimentos industrializados (BIOFORT, 2018b; BOUIS et al., 2011).

Em âmbito mundial esse programa vem sendo desenvolvido pela HarvestPlus, uma aliança de instituições de pesquisas e entidades executoras, e no Brasil é coordenado pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), através da Rede BioFORT, que é um conjunto de projetos responsáveis pela biofortificação de alimentos no Brasil (BIOFORT, 2018b).

A biofortificação de alimentos apresenta como objetivo principal reduzir a desnutrição e garantir maior segurança alimentar através do aumento dos teores de ferro, zinco e vitamina A na dieta de populações mais carentes, uma vez que a deficiência desses micronutrientes ainda causam grandes problemas de saúde pública no Brasil (BOUIS, 2000a).

A baixa biodisponibilidade desses micronutrientes nos alimentos mais consumidos por essas populações torna a biofortificação de culturas alimentares básicas uma estratégia para ajudar a amenizar essas deficiências (LA FRANO et al., 2014). Em princípio, esta estratégia permite que a população consuma os mesmos alimentos que estão acostumados, enquanto melhoram a ingestão de micronutrientes importantes para a saúde (SALTZMAN et al., 2013).

Atualmente o programa desenvolve a biofortificação de alimentos básicos como arroz, feijão, feijão-caupi, mandioca, batata-doce, milho, abóbora e trigo, utilizando mecanismos viáveis e efetivos em termos de custos, uma vez que estes alimentos já fazem parte da tradição de consumo da maioria da população, além de apresentarem baixo custo (BIOFORT, 2018b).

As variedades biofortificadas estão em constantes estudos, uma vez que além dos benefícios nutricionais, é importante associar também vantagens agronômicas e comerciais. Ainda, é extremamente importante que os alimentos tenham boa aceitação e seus nutrientes estejam biodisponíveis para que os objetivos do programa sejam alcançados, ou seja, acesso a uma alimentação mais nutritiva e com baixo custo para populações de baixa renda (GENC et al., 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana, Técnica Dietética do Departamento de Farmácia e Nutrição, Química de Alimentos, Operações Unitárias do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus Alegre.

### 4.1 Matéria-Prima

Foi utilizado como matéria-prima do estudo o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walph), cultivar convencional BRS Nova Era e o cultivar biofortificado BRS Tumucumaque. Ambos foram obtidos da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA Meio-Norte), através do programa de melhoramento genético (BioFort), provenientes da cidade de São Raimundo das Mangabeiras, estado do Maranhão. Os feijões foram adquiridos em Maio de 2017.

O feijão-caupi BRS Nova Era e BRS Tumucumaque são cultivares de coloração branca, apresentam grãos com tegumento liso e halo preto (EMBRAPA, 2018ab), conforme Figura 2.

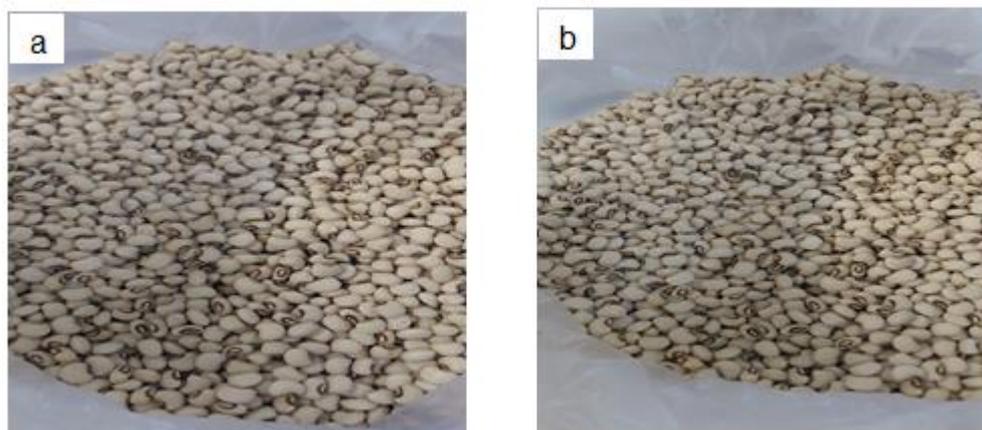


Figura 2. Feijão-caupi cru. a: Feijão-caupi BRS Nova Era; b: Feijão-caupi BRS Tumucumaque.

## 4.2 Desenho experimental

Na Figura 3 está apresentado o desenho experimental do estudo, exemplificando as análises que foram realizadas no decorrer do experimento.

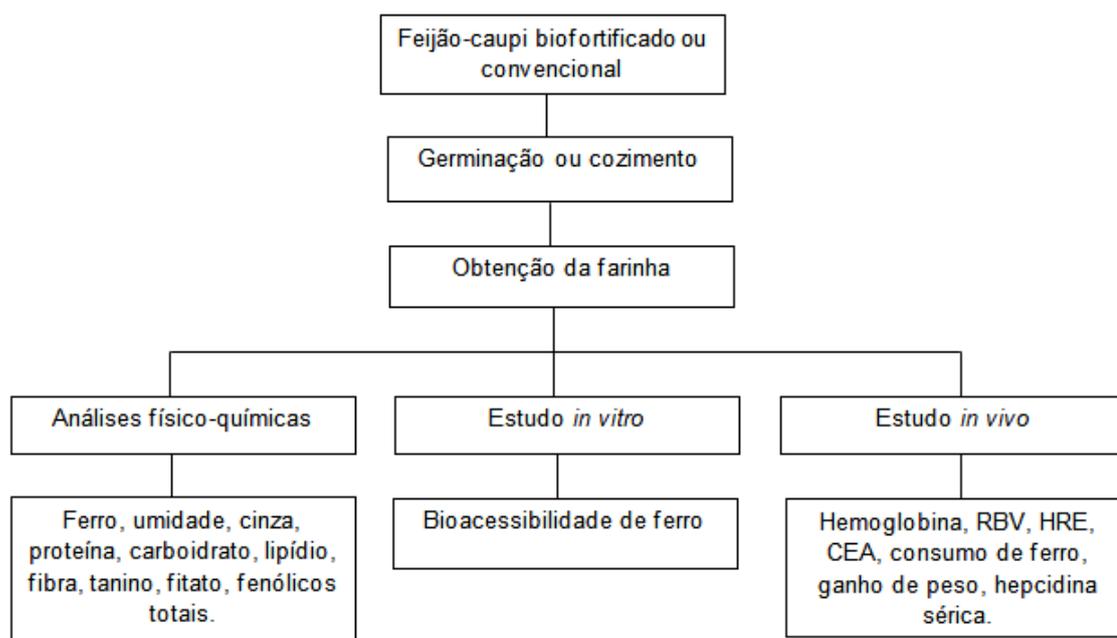


Figura 3. Desenho experimental do estudo. RBV= Valor biológico relativo; HRE= Eficiência de regeneração de hemoglobina; CEA= Coeficiente de eficiência alimentar.

## 4.3 Germinação do feijão convencional e biofortificado

Os grãos de feijão foram mantidos em água deionizada por 4 horas na proporção 1:2 (p:v). Após esse período, a água em excesso foi retirada para então iniciar o período de germinação. Os feijões foram dispostos em bandejas de polietileno e mantidos em estufa incubadora refrigerada tipo BOD (CLIMATEC) a  $28 \pm 2$  °C por 72 horas, de acordo com estudos anteriores (LIMA, 2016; MENDOZA-SÁNCHEZ et al., 2016). Os grãos foram umedecidos 2 vezes ao dia, no período da manhã e no final da tarde, para garantir umidade necessária para ocorrer a germinação (DONANGELO et al., 1995; FERREIRA; BORGHETTI, 2004; SÁNCHEZ et al., 2016).

#### **4.4 Cozimento do feijão convencional e biofortificado**

Os grãos foram mantidos em água deionizada por 4 horas, na proporção de 1:2 (p:v). Decorrido esse tempo, a água foi drenada e, em seguida adicionada água deionizada para realizar a cocção do feijão na proporção de 1:2 (p:v). O cozimento foi realizado em panelas de pressão previamente lavadas com água deionizada e permaneceram em cocção por 20 minutos em fogo baixo após início da pressão.

#### **4.5 Obtenção da farinha dos feijões**

Os feijões, após o processo de germinação ou cozimento, foram submetidos à secagem em estufa (STECK) com circulação de ar a 60°C até peso constante. O feijão cozido foi seco juntamente com a água utilizada na cocção. Após secagem, o feijão foi moído em liquidificador para obtenção de uma farinha fina e homogênea e, posteriormente, acondicionadas em embalagens laminadas e mantidas sob refrigeração até utilização.

#### **4.6 Caracterização físico-química**

Foi realizada a caracterização físico-química da farinha de feijão-caupi biofortificado e convencional, submetidos à germinação ou cozimento.

##### **4.6.1 Composição centesimal**

Foi determinada a umidade de acordo com procedimento padrão descrita pela AOAC (2005) em estufa (BIOPAR) a 105°C até peso constante.

O teor total de nitrogênio foi quantificado pelo método de Kjeldahl, como descrito pela AOAC (2005). O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o resultado encontrado de nitrogênio pelo fator 6,25.

Lipídio foi determinado por extração em Soxhlet de acordo com o método descrito pela AOAC (2005), utilizando éter de petróleo como o solvente extrator.

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla (STECNO) a 550°C, conforme o método descrito pela AOAC (2005).

Fibras solúveis e insolúveis foram quantificadas pelo método enzimático-gravimétrico, utilizando  $\alpha$ -amilase termorresistente, protease e amiloglicosidase (Sigma®) para a realização da hidrólise enzimática. Para a filtração utilizaram-se cadinhos de vidro com placa de vidro com porosidade e celite como auxiliar de filtração. A fibra total foi determinada pela soma da fibra solúvel e insolúvel (ASP et al., 1983).

Carboidrato foi calculado por diferença, subtraindo-se a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade, cinzas e fibras de 100.

#### **4.6.2 Determinação de Ferro**

A quantidade de ferro das farinhas de feijão foi determinada por absorção atômica (AOAC, 1997). Foram pesados 0,5 gramas de amostra em tubo digestor e adicionados 10 mL de ácido nítrico P.A. Em seguida foi realizada uma pré-digestão com tubos abertos em capela durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram digeridas em micro-ondas MARS 6 (CEM Corporation®), envolvendo três passos:

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

Após a digestão, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água deionizada. As amostras foram lidas em espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Thermo Scientific®, modelo ICE 3000 Series).

#### **4.6.3 Fatores antinutricionais**

##### **4.6.3.1 Determinação de taninos**

Os taninos foram analisados segundo Price et al. (1978). Amostras de 0,2 g das farinhas de feijão foram suspensas em 10 mL de solução a 1% de HCl em

metanol. Os tubos foram colocados em agitação a 80 rpm durante 20 minutos para a extração dos taninos. Em seguida foram centrifugados a 3.000 rpm, por 20 minutos (Thermo Fisher Scientific, Heraeus Megafuge 16R), e do sobrenadante, alíquotas de 1 mL foram retirados e colocadas em tubo de ensaio. A cada alíquota foram adicionadas 2,5 mL de solução a 1% de vanilina em metanol e 2,5 mL de solução a 8% de HCl em metanol. Os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos e as absorbâncias foram medidas a 500 nm em leitor de ELISA (Thermo Fisher Scientific, MULTISKAN GO). Foi construída uma curva analítica de catequina, no qual 200 mg do composto foram diluídos em 200 mL de metanol, sendo o volume ajustado em balão volumétrico. Alíquotas de 5, 10, 20, 25 e 50 mL foram retiradas dessa solução concentrada de catequina e metanol, e o volume foi ajustado para 100 mL em balão volumétrico com metanol. Em seguida, procedeu-se da mesma maneira indicada para a determinação dos taninos nas amostras que foram substituídas por essas soluções. Por meio da equação de regressão linear ( $R^2=0,9987$ ) foi expresso o teor de taninos em miligrama de Equivalente de Catequina/grama de amostra (EC/g).

#### **4.6.3.2 Determinação de fitatos**

O teor de ácido fítico foi analisado segundo metodologia descrita pela AOAC (1990), adaptada por Latta; Eskin (1980). Foi pesado 1g de amostra em um erlenmeyer e adicionou-se 5 mL de HCl a 2,4% e realizada incubação em banho-maria a temperatura ambiente e agitação constante por 12h. As amostras contidas nos erlenmeyers foram filtradas utilizando bomba à vácuo e papel filtro de Whatman.

Em seguida, foi realizada a passagem do filtrado em coluna de troca iônica com fase estacionária constituída por resina Dowex- AGX-4. A coluna foi pré-condicionada com NaCl 2M e o extrato obtido foi aplicado cuidadosamente à mesma. Os fósforos inorgânicos foram eluídos com NaCl 0,05M, seguida da eluição dos fitatos retidos com NaCl 2M. O fitato foi determinado colorimetricamente, com base na coloração rósea do reagente de Wade (0,03 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  e 0,3 g de ácido sulfosalicílico, diluídos em 100 mL de água deionizada), que é formado a partir da reação entre o íon férrico e o ácido sulfosalicílico. Na presença de fitato, o ferro é sequestrado e indisponível para reagir com o ácido sulfosalicílico, resultando em redução da intensidade da cor. Foi elaborada uma curva padrão de fitato de sódio e

a leitura foi realizada por espectrofotometria em aparelho ELISA (Thermo Fisher Scientific, MULTISKAN GO) a 500 nm.

#### **4.6.3.3 Determinação de compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Singleton et al. (1999), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Os extratos foram obtidos a partir da extração com metanol 70% (v/v). Em tubos de ensaio foram adicionados 600 µL de amostra e 3 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 10 vezes em água destilada. Após repouso de 3 minutos foram adicionados 3,4 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v) e após uma hora de repouso foi realizada a medição da absorbância em aparelho ELISA (Thermo Fisher Scientific, MULTISKAN GO) a 760 nm.

A quantificação do teor de compostos fenólicos totais foi efetuada utilizando curva padrão de ácido gálico por meio da equação de regressão ( $y = 13,858x + 0,1228$ ;  $R^2 = 0,9952$ ) para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra (mg EAG/100 g).

#### **4.6.4 Determinação da Razão molar fitato:ferro**

A partir dos teores obtidos das análises de ferro e fitato dos feijões, calculou-se a razão molar fitato:ferro, de acordo com a fórmula abaixo, sendo 659,91 o peso molecular do fitato e 55,8 o peso atômico do ferro.

$$\text{Razão molar fitato:ferro} = [\text{Fitato (g)} / 659,91] / [\text{Ferro (g)} / 55,8]$$

### **4.7 Estudo *in vitro***

#### **4.7.1 Bioacessibilidade de ferro**

A digestão *in vitro* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Megías et al. (2009), no qual utiliza as enzimas pepsina e pancreatina, simulando a digestão gastrointestinal.

Primeiramente foi adicionada às amostras água deionizada e o pH foi ajustado para 2,0 com HCl 0,1N. Em seguida, adicionada pepsina para simular a

digestão gástrica. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C sob agitação por 2 horas. Como forma de simular digestão intestinal o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 0,1N e adicionado pancreatina, ativada em meio básico. As amostras foram novamente incubadas em banho-maria a 37°C, sob agitação por 2 horas. Em seguida, para inativação enzimática, as amostras foram incubadas a 75°C durante 20 minutos em banho-maria. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados e liofilizados por 48 h e estocados a -20°C, permanecendo até a realização da análise para determinação de ferro, conforme metodologia descrita no item 4.6.2.

## **4.8 Ensaio biológico**

### **4.8.1 Ética**

O experimento com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Espírito Santo, protocolo nº 72/2016 (ANEXO 1).

### **4.8.2 Delineamento Experimental**

A avaliação da biodisponibilidade de ferro foi realizada pelo método depleção-repleção da AOAC (1998) com adaptação para 21 dias de depleção e apenas um único nível de repleção (12 mg Fe.kg<sup>-1</sup>). Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, recém desmamados, com 21 dias de idade, peso inicial médio de 80 gramas, oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS/UFES). Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada a 23 °C e ciclo claro e escuro de 12 horas.

No período de depleção (21 dias), todos os animais receberam dieta adaptada da AIN-93G para roedores (REEVES et al., 1993), isenta de ferro (Tabela 1) e água deionizada *ad libitum*, com o objetivo de induzir anemia ferropriva.

Na fase de repleção (14 dias), os animais anêmicos foram divididos em cinco grupos com oito animais em cada, de forma que a concentração média de

hemoglobina fosse a mais próxima possível entre os grupos, a saber: Grupo controle Sulfato ferroso (SF), Tumucumaque Cozido (TC), Tumucumaque Germinado (TG), Nova Era Cozido (NC), Nova Era Germinado (NG). Todos os grupos receberam suas respectivas dietas experimentais com objetivo de recuperar os níveis de hemoglobina, tempo durante o qual receberam água deionizada *ad libitum* e ingestão de dieta controlada de aproximadamente 18 gramas por dia. As dietas foram preparadas para fornecer 12 mg Fe.kg<sup>-1</sup> de dieta procedente do sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>, dieta controle) e 12 mg Fe.kg<sup>-1</sup> procedente dos feijões (dietas teste) (Tabela 1).

O peso dos animais e seu consumo alimentar foram monitorados semanalmente, durante as duas fases experimentais. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi determinado pela expressão que relaciona o ganho de peso total dos animais (g) pelo consumo total de dieta (g) x 100.

#### **4.8.3 Dietas Experimentais**

As dietas foram preparadas de acordo com as normas da AIN-93G para roedores (REEVES et al., 1993) (Tabela 1).

A albumina foi utilizada como fonte proteica. Inicialmente todos os ingredientes foram misturados manualmente e depois foram misturados em uma batedeira semi industrial (VENÂNCIO®) por 20 minutos. As dietas prontas foram acondicionadas em sacos e armazenadas em geladeira a 10 °C. Todos os utensílios utilizados no preparo das dietas foram lavados com água deionizada.

Na dieta controle utilizou como fonte de ferro o sulfato ferroso e nas dietas experimentais, os feijões foram adicionados em quantidade adequada para fornecer 12 mg Fe.kg<sup>-1</sup> de ferro, tendo os demais ingredientes manipulados de acordo com a composição do feijão adicionado, para que as dietas fossem similares.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais das fases de Depleção e Repleção (g/1000 g de dieta).

Ingredientes	Depleção	Repleção				
		SF	NC	NG	TC	TG
Feijão*	-	-	254,46	254,26	224,70	190,26
Albumina <sup>1</sup>	200	200	106,9	107,23	107,04	116,22
Maltodextrina	132	132	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	70	70	70	70	70	70
Celulose	50	50	-	-	-	-
Mix de	35	35	35	35	35	35
Minerais sem ferro						
Mix de	10	10	10	10	10	10
Vitaminas						
L-cistina	3	3	3	3	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido <sup>2</sup>	397,50	397,44	286,14	286,01	315,76	341,02
Sulfato Ferroso	-	0,05979*	-	-	-	-
Teor de ferro (mg/kg)	-	11,02	15,23	15,00	17,96	15,87

\*Quantidade suficiente para fornecer 12 mg Fe.kg<sup>-1</sup> de dieta.

<sup>1</sup>Quantidade suficiente para fornecer 170 g proteína/kg de dieta.

<sup>2</sup>Quantidade para fornecer 1 kg de dieta.

SF = Sulfato ferroso, NC = Nova Era Cozido, NG = Nova Era Germinado, TC = Tumucumaque Cozido, TG = Tumucumaque Germinado.

#### 4.8.4 Determinação dos parâmetros hematológicos

Ao término do período de depleção (21 dias) e repleção (14 dias) foram coletadas amostras de sangue por gotejamento, após incisão da porção terminal da cauda dos animais para a determinação da concentração de hemoglobina. A dosagem de hemoglobina foi realizada segundo o método do cianetohemoglobina (AOAC, 1998), utilizando-se o Kit de hemoglobina Bioclin®. Nesse método, após secção da porção terminal da cauda de cada animal e gotejamento em vidro de relógio, 10µL de sangue foram misturados a 2,5 mL de solução de cianeto e ferrocianeto de potássio (solução de Drabkin), sendo o íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>) da hemoglobina oxidado para o estado férrico (Fe<sup>3+</sup>) pelo ferrocianeto de potássio formando metahemoglobina, que se combina com cianeto de potássio originando o cianeto de metahemoglobina. Uma alíquota de 250 µL de cada amostra foi pipetada em microplaca de 96 poços, para posterior leitura a 540 nm em aparelho ELISA

(Thermo Fisher Scientific, MULTISKAN GO). A cor resultante dessa reação é proporcional à concentração de hemoglobina no sangue dos animais (NELSON; MORRIS, 1995). Para cálculo da concentração de hemoglobina das amostras de sangue foi utilizado como referência o valor de leitura da absorbância de uma solução padrão de hemoglobina Bioclin® de concentração correspondente a 11,6 g/dL.

Após o período de repleção (14 dias) os animais foram anestesiados utilizando anestésico ketamina combinado com relaxante muscular xilazina, de acordo com o peso, pela via intraperitoneal, e foi coletado cerca de 5 mL de sangue por punção cardíaca e acondicionados em tubos com anticoagulante (VACUETTE® K3EDTA), e estes foram centrifugados por 10 minutos a 4°C e 3000 x g (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Heraeus Megafuge 16R) para separação do plasma, que foi utilizado para posterior análise de Hepsidina.

O ganho de hemoglobina foi calculado pela diferença da concentração da hemoglobina (Hb) do período final e inicial de repleção.

O pool de ferro na hemoglobina foi calculado assumindo que o volume total de sangue é de 6,7% do peso corporal e o conteúdo de ferro na hemoglobina é 0,335%, conforme fórmulas abaixo:

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

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

A eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE) e o valor biológico relativo (RBV) foram estimados de acordo com Manhoney; Van Orden; Hendricks (1974), conforme fórmulas a seguir:

$$\% \text{ HRE} = \text{mg Hb-Fe final} - \text{mg Hb-Fe inicial} / \text{Fe consumido (mg)}$$

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

#### **4.8.4.1 Dosagem sérica de Hepsidina**

Para determinação dos níveis de Hepsidina sérica foi utilizado kit de ELISA (Quantikine® R&Dsystems™ a biotechne brand) seguindo as recomendações do fabricante.

Primeiramente, o padrão foi reconstituído com 1 mL do diluente, ambos

fornecidos pelo kit e deixado em repouso por uma hora antes da sua utilização nos ensaios. A concentração do padrão nessa solução estoque é de 10.000 pg/mL. Essa solução foi utilizada para diluições de 1.000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL, 15,6 pg/mL e 0 pg/mL para construção da curva padrão.

Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 50  $\mu$ L de Diluente de Ensaio RD1-21 e 50  $\mu$ L da amostra, que foram encubados por 2 horas em temperatura ambiente. Percorrido esse tempo, os poços foram lavados com tampão de lavagem e posteriormente adicionado 200  $\mu$ L de Conjugado de Hepsidina Humana a cada poço e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Após, realizou-se outra lavagem e adicionou 200  $\mu$ L de Solução de Substrato a cada poço e incubou durante 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Decorrido o tempo, adicionou-se 50  $\mu$ L de solução de parada e foi realizada a leitura em leitor de ELISA (Thermo Fisher Scientific, MULTISKAN GO) a 450 nm.

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise dos resultados foram aplicados os testes estatísticos Análise de Variância (ANOVA) acompanhada pelo teste de Tukey para testar as diferenças nos valores intergrupos.

O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism®, versão 6.0 (La Jolla, CA, USA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Composição centesimal

Na Tabela 2 consta a composição centesimal do feijão-caupi convencional e biofortificado submetido ao processo de cozimento e germinação.

Tabela 2. Composição centesimal do feijão-caupi convencional (BRS Nova Era) e biofortificado (BRS Tumucumaque) submetidos ao cozimento e germinação.

	Convencional		Biofortificado	
	Cozido	Germinado	Cozido	Germinado
Umidade (g/100g)	5,54 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,12 ± 0,52 <sup>a</sup>	5,65 ± 0,51 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,58 <sup>a</sup>
Cinza (g/100g)	3,27 ± 0,08 <sup>b</sup>	3,39 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,92 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,98 ± 0,11 <sup>a</sup>
Proteína (g/100g)	24,80 ± 0,85 <sup>b</sup>	24,69 ± 0,44 <sup>b</sup>	28,02 ± 0,33 <sup>a</sup>	28,27 ± 0,23 <sup>a</sup>
Lipídio (g/100g)	2,00 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,46 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,36 <sup>b</sup>
Carboidrato (g/100g)	46,30 ± 1,48 <sup>a</sup>	46,76 ± 0,85 <sup>a</sup>	44,19 ± 0,47 <sup>a</sup>	43,74 ± 0,92 <sup>a</sup>
Fibra Total (g/100g)	18,09	18,02	17,14	17,91
Solúvel (g/100g)	2,96	2,27	3,24	3,72
Insolúvel (g/100g)	15,13	15,75	13,90	14,19
Ferro (mg/kg)	47,15 ± 0,06 <sup>b</sup>	47,19 ± 0,39 <sup>b</sup>	69,42 ± 1,94 <sup>a</sup>	69,74 ± 0,79 <sup>a</sup>

Valores expressos em média e desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Em relação aos dados de composição centesimal observa-se que não houve diferença estatística entre os feijões de mesmo cultivar, quando comparado o cozimento e a germinação.

Verifica-se que o feijão biofortificado apresenta maior percentual de proteínas e menor teor de lipídios quando comparado ao convencional ( $p \leq 0,05$ ), corroborando com outros trabalhos realizados com feijão biofortificado (BIGONHA, 2013; BARROS et al., 2013).

O teor de fibras total, solúvel e insolúvel mantiveram valores semelhantes aos reportados na literatura, em torno de 19 g/100 g de fibra total, 16 de insolúvel e 2 de solúvel (FROTA et al., 2008), apresentando elevado conteúdo de fibra insolúvel, característico dos feijões. O conteúdo de fibra pode exercer um efeito negativo na

biodisponibilidade de minerais, interferindo na absorção dos minerais, através da diminuição do tempo de trânsito intestinal provocado pelas fibras. Em indivíduos com a deficiência de minerais já instaladas, esse efeito negativo das fibras em relação à biodisponibilidade pode apresentar maior destaque (ROSS et al., 2000).

Verifica-se que os teores de ferro (Tabela 2) da variedade convencional (BRS Nova Era) encontra-se próximo dos valores relatados na literatura, que gira em torno de 50 mg/kg de feijão (BIOFORT, 2018a). Em relação à variedade biofortificada (BRS Tumucumaque), verifica-se valores inferiores aos reportados na literatura, que são de 77 mg/kg (BIOFORT, 2018a). Porém mantem-se valores significativamente superiores à variedade convencional ( $p < 0,05$ ), conforme esperado por se tratarem de variedades biofortificadas.

Assim, o feijão-caupi considerado biofortificado, alvo desta pesquisa, ainda não atingiu o patamar recomendado da biofortificação, uma vez que o objetivo é a produção de cultivares que atinjam a concentração de 50% superior aos cultivares convencionais (WELCH et al., 2000). Porém, com as concentrações encontradas verifica-se que estas são variedades promissoras para a biofortificação, uma vez que no presente estudo obteve-se um percentual de 46,8% a mais de ferro em relação a variedade convencional. A biodisponibilidade de ferro é um fator importante a ser considerado, e não somente o percentual de acréscimo no teor de mineral.

Ainda, deve-se levar em consideração o tipo de solo no qual o feijão foi plantado, pois este pode interferir nos teores de minerais obtidos, havendo variação entre diferentes localidades e tipos de solos (MARQUEZI, 2013).

No presente estudo não houve diferença estatística em relação ao feijão germinado e cozido, permanecendo todos os tratamentos com teor de ferro semelhante (Tabela 2). Silva (2011) encontrou maior teor de ferro no feijão germinado, comparando este com o grão cru.

Lee et al. (1990) verificaram a influência da germinação na composição química de feijões em diferentes dias de germinação (1, 3 e 5 dias) e constataram que o conteúdo de ferro diminuiu até o terceiro dia de germinação e aumentou no quinto dia. Assim, no estudo atual, o tempo utilizado para a germinação pode ter sido um fator determinante para não ter encontrado diferença nos teores de ferro, uma vez que o tempo utilizado foi de três dias, sendo este o período da germinação

que o estudo demonstrou que ocorre redução desse mineral.

## 6.2 Fatores antinutricionais

A Tabela 3 demonstra os teores de taninos, fitatos e compostos fenólicos totais presentes no feijão-caupi convencional e biofortificado submetidos ao processo de cozimento e germinação.

Tabela 3. Fatores antinutricionais presentes no feijão-caupi convencional (BRS Nova Era) e biofortificado (BRS Tumucumaque).

	Convencional		Biofortificado	
	Cozido	Germinado	Cozido	Germinado
Taninos (g EC/100g)	0,51 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,07 <sup>a</sup>
Fitatos (g/100g)	0,20 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>a</sup>
Fenólicos (mg EAG/100g)	0,56 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,05 ± 0,63 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,45 ± 1,15 <sup>a</sup>

Valores expressos em média e desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. EC = Equivalente de Catequina, EAG = Equivalente de ácido gálico.

O teor obtido das análises de taninos demonstra valores semelhantes para todos os grupos experimentais, não apresentando diferença estatística entre os cultivares convencionais ou biofortificados, assim como para o processamento cozido ou germinado.

Os taninos concentram-se, em sua maioria, na casca do feijão, estando presente, principalmente, em feijões com tegumento de coloração escura, como feijão vermelho e preto. Os feijões brancos possuem teores muito baixos comparados aos vermelhos e pretos, que apresentam níveis significativamente maiores, (WELCH et al., 2000; BRESSANI et al., 1991). Pinto (2016) obteve teores de taninos no feijão branco de 0,43 g/100g, e para o vermelho e preto 0,67 e 1,17 g/100g, respectivamente. Assim, os valores de taninos encontrados na atual pesquisa são consistentes com o esperado, uma vez que o feijão alvo do estudo é de uma variedade branca.

A maceração tem um papel importante na redução de taninos presentes no feijão, pois estes podem migrar para a água de maceração e para o caldo de cocção (GOYCOOLEA et al., 1993; COSTA et al., 2001). Neste trabalho, os feijões

passaram por um período de maceração com posterior descarte desta água antes do processo de cozimento e germinação, o que pode explicar a baixa concentração desse fator antinutricional nas amostras avaliadas.

Os feijões passaram pelo processo de secagem, podendo a temperatura ter influenciado na redução de taninos, visto que Manole et al. (2009) demonstraram que o tratamento térmico aplicado no feijão causou uma redução no teor desse composto.

O feijão biofortificado apresentou valores superiores de fitatos em relação ao convencional, apesar de não serem diferentes estatisticamente. Ainda, manteve valores semelhantes entre cozido e germinado em relação ao mesmo cultivar. Ghavidel et al. (2007) encontraram valores superiores ao do presente estudo, apresentando o feijão-caupi germinado teores de fitato de 0,48 g/100 gramas.

Alguns fatores influenciam a ligação do fitato com minerais, como pH, concentração e presença de minerais. Sob condições naturais, o fitato encontra-se carregado negativamente, e isso faz com que ele tenha um grande potencial de se ligar a moléculas carregadas positivamente, como minerais e proteínas (SILVA; SILVA, 1999).

Durante o processo de germinação, por ação de fitases endógenas, o hexafosfato de mioinositol ( $IP_6$ ) pode ser parcialmente desfosforilado e produzir com isso pentafosfato ( $IP_5$ ), tetrafosfato ( $IP_4$ ), trifosfato ( $IP_3$ ), inositol difosfato ( $IP_2$ ) e monofosfato ( $IP_1$ ) (SILVA; SILVA, 1999). Dentre esses compostos, o  $IP_1$ ,  $IP_2$ ,  $IP_3$  e  $IP_4$  possuem baixa capacidade de se ligar a proteínas e minerais ou os complexos que são formados por estes são mais solúveis. Enquanto o  $IP_5$  e  $IP_6$  tem maior influência na biodisponibilidade de minerais e proteínas, pois formam complexos insolúveis com estes compostos (BONETT et al., 2007).

A enzima fitase, que está presente em diversas leguminosas, entre elas o feijão, se torna ativa durante o processo de germinação. Assim, esperava-se obter menor teor de fitato no grupo germinado, porém, não foi observado esses resultados, uma vez que não obteve-se diferença estatística entre os grupos (RICHARD; THOMPSON, 1997; STANLEY, AGUILERA, 1985).

Em relação aos teores de compostos fenólicos totais, as variedades que foram germinadas, para todos os cultivares, apresentaram diferença estatística

( $p \leq 0,05$ ) em relação ao cozimento, apresentando valores superiores. Esses valores superiores podem ser devido ao processo de cozimento acarretar em maior perda desses compostos, variando de 2 a 39% de perdas (BASSINELLO et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Martinez (2011).

O processo de biofortificação, com aumento do conteúdo de ferro nos feijões pode desencadear alterações na composição deste alimento, como aumentar o teor de alguns componentes, por exemplo, fatores antinutricionais, que consequentemente podem interferir no valor nutricional (TAKO et al., 2015; WELCH et al., 2000). Contudo, pesquisas devem ser aprofundadas com o intuito de melhorar esse processo para que ocorram os benefícios propostos.

Diante dos resultados obtidos, podemos confirmar resultados positivos em relação à germinação, se comparada ao cozimento, demonstrando eficácia em manter níveis na mesma proporção do processo de cozimento de componentes capazes de interferir no valor nutritivo do feijão.

A partir dos valores obtidos de fitato e ferro presente nos feijões, calculou-se a razão molar fitato:ferro, obtendo os valores demonstrado abaixo (Tabela 4).

Tabela 4. Razão molar fitato:ferro dos feijões.

Tratamento	Razão molar fitato:ferro
NC	3,58 <sup>a</sup>
NG	3,94 <sup>a</sup>
TC	3,41 <sup>a</sup>
TG	3,51 <sup>a</sup>

Valores expressos em média e desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. NC=Nova Era Cozido; NG=Nova Era Germinado; TC=Tumucumaque Cozido; TG=Tumucumaque Germinado.

A capacidade de absorção de ferro está associada a razão molar fitato:ferro, sendo que valores superiores a 14 podem comprometer a biodisponibilidade de ferro em humanos e animais (RICHARD; THOMPSON, 1997; LESTIENE et al., 2005).

A razão molar fitato:ferro obtido para os feijões estão abaixo do valor considerado prejudicial para a biodisponibilidade de ferro, demonstrando que tanto o cozimento quanto a germinação são eficientes em reduzir fitatos de modo que não interfiram na biodisponibilidade de ferro.

Vaz-Tostes et al. (2016) obtiveram valores de razão molar fitato:ferro de 7,27 para o feijão biofortificado e 8,53 para o feijão convencional, e estes valores não interferiram na biodisponibilidade de ferro no experimento *in vivo*.

No estudo de Bigonha (2013), a diferença obtida em relação a biodisponibilidade não foi devido à razão molar fitato/ferro, mas aos flavonoides presentes na casca, principalmente no feijão colorido, o qual contribuiu para a baixa biodisponibilidade de minerais.

Assim, os efeitos da germinação em relação à composição química, compostos antinutricionais e constituintes bioquímicos podem variar muito de acordo com as condições utilizadas no processo de germinação, como tempo aplicado, temperatura, umidade, presença ou ausência de luz, assim como cultivar e também os métodos de análises aplicados (BAU et al., 1997).

### 6.3 Estudo *in vitro*

#### 6.3.1 Bioacessibilidade do ferro dos feijões

Com o objetivo de verificar a concentração de ferro disponível para ser absorvido após sua passagem pelo trato gastrintestinal, avaliou-se o teor de ferro da fração digerível das amostras de feijão (Tabela 5), demonstrando os valores de ferro bioacessível.

Tabela 5. Bioacessibilidade de ferro dos feijões.

Grupos	Bioacessibilidade Fe (mg/kg)	Percentual bioacessível (%)
NC	8,75 ± 0,34 <sup>d</sup>	18,55
NG	10,78 ± 0,26 <sup>c</sup>	22,84
TC	12,72 ± 0,42 <sup>b</sup>	18,32
TG	15,01 ± 0,82 <sup>a</sup>	21,52

Dados expressos em média e desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. SF= Sulfato ferroso, NC= Nova Era Cozido, NG= Nova Era Germinado, TC= Tumucumaque Cozido, TG= Tumucumaque Germinado.

Através dos resultados obtidos da bioacessibilidade de ferro, verifica-se que os feijões que foram germinados apresentaram valores superiores ( $p \leq 0,05$ ) ao

cozido. Este resultado demonstra a eficácia do processo de germinação e cocção, uma vez que a bioacessibilidade indica possivelmente a quantidade de ferro que possivelmente poderá ser absorvido pelo organismo após o processo de digestão gastrointestinal. O cálculo do percentual de ferro bioacessível também demonstra que a germinação apresentou maior bioacessibilidade de ferro.

Ainda, o feijão biofortificado apresentou resultados mais elevados que o cultivar convencional, resultados estes devido ao maior teor de ferro no feijão biofortificado.

Na pesquisa de Ghavidel et al. (2006), avaliando o impacto da germinação na bioacessibilidade de ferro em diferentes leguminosas, obteve assim como no presente estudo, aumento significativo do ferro biodisponível do feijão-caupi que foi germinado.

Em relação à biodisponibilidade de ferro, deve-se levar em consideração a quantidade desse mineral que será absorvida e utilizada pelo organismo, ou seja, o processo completo de ação do ferro no organismo, enquanto a bioacessibilidade tem sido definida como a fração que é liberada do alimento no trato gastrointestinal e, assim, torna-se disponível para a absorção intestinal, indicando a fração do ferro disponível que poderá ser assimilada pelo organismo. Assim, o estabelecimento da bioacessibilidade de um nutriente pode ser considerado uma estimativa de sua biodisponibilidade (BENITO; MILLER, 1998; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; TAKO et al., 2016).

A digestão *in vitro* não apresenta a complexidade do processo digestivo humano, porém, essa metodologia tem sido utilizada com o objetivo de apresentar informações preliminares sobre a estimativa da biodisponibilidade de determinados nutrientes devido a sua correlação positiva com os experimentos utilizando modelos *in vivo* (HARO-VICENTE et al., 2006; HUR et al., 2011).

O feijão germinado apresentou maior bioacessibilidade de ferro, o qual contribui para estudos que pesquisem diferentes dias de germinação, assim como diferentes metodologias aplicadas, que apresentem maior biodisponibilidade de ferro no feijão germinado.

Ainda, deve-se levar em consideração que a biodisponibilidade de ferro do feijão depende de vários fatores, tais como a cor do tegumento, o tipo de

processamento utilizado e quantidade de fatores antinutricionais. De acordo com Tako et al. (2010), o ferro é mais biodisponível em feijões de coloração branca, corroborando com outros estudos (HU et al., 2006; LUNG'AHO et al., 2010), há aumento dessa biodisponibilidade, ao remover a casca, uma vez que a maioria dos fatores antinutricionais encontra-se na casca do feijão (GHAVIDEL et al., 2007).

## 6.4 Ensaio Biológico

### 6.4.1 Ganho de peso e Consumo alimentar

O ganho de peso dos animais é apresentado na Figura 4. Conforme observado, não houve diferença ( $p>0,05$ ) em relação ao peso dos animais entre os grupos experimentais em ambas as fases, depleção e repleção.

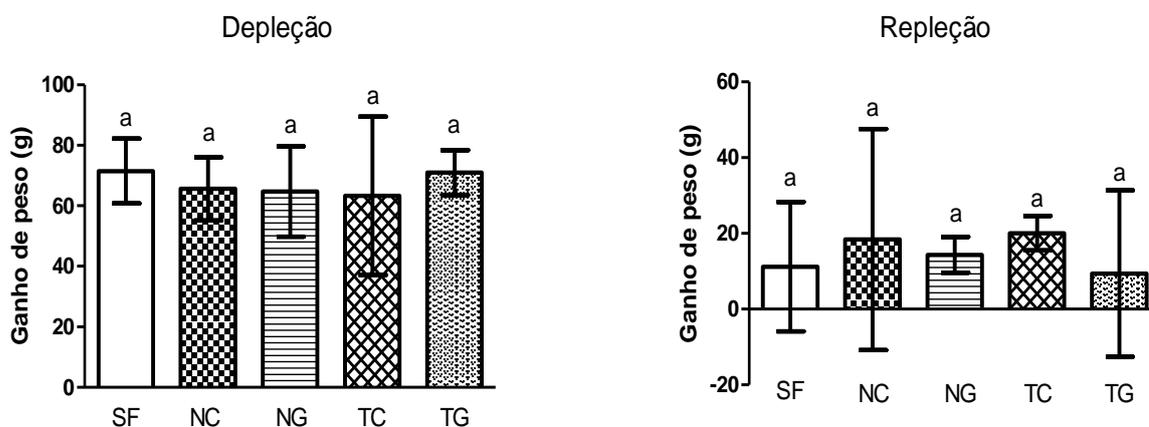


Figura 4. Ganho de peso (g) dos grupos experimentais nas fases de depleção e repleção. Dados expressos em média e desvio padrão (n=8). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p\leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. SF= Sulfato ferroso, NC= Nova Era Cozido, NG= Nova Era Germinado, TC=Tumucumaque.

O Consumo Alimentar (CA), Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) e Consumo de Ferro (Cons Fe) dos grupos experimentais são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Consumo Alimentar (CA), Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), Teor de ferro da dieta e Consumo de Ferro (Cons Fe) na fase de repleção.

Grupos	CA (g)	CEA (%)	Cons Fe (mg) na repleção
SF	223,48 ± 14,92 <sup>a</sup>	26,23 ± 3,67 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,16 <sup>a</sup>
NC	215,91 ± 29,71 <sup>a</sup>	27,73 ± 4,93 <sup>a</sup>	3,29 ± 0,45 <sup>a</sup>
NG	224,26 ± 21,77 <sup>a</sup>	29,44 ± 1,83 <sup>a</sup>	3,36 ± 0,33 <sup>a</sup>
TC	221,73 ± 20,25 <sup>a</sup>	29,28 ± 3,21 <sup>a</sup>	3,98 ± 0,36 <sup>a</sup>
TG	225,49 ± 16,92 <sup>a</sup>	27,52 ± 3,79 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,27 <sup>a</sup>

Dados expressos em média e desvio padrão (n=8). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferiu entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). SF= Sulfato ferroso, NC= Nova Era Cozido, NG= Nova Era Germinado, TC= Tumucumaque Cozido, TG= Tumucumaque Germinado.

Analisando o consumo alimentar (CA), não houve diferença estatística entre os grupos, uma vez que a oferta de dietas foi realizada de forma controlada e com a mesma quantidade para ambos os grupos, 18 gramas por dia.

O Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), que relaciona o ganho de peso dos animais com o consumo de dietas, também não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais.

Em relação ao consumo de ferro, todos os grupos apresentaram um consumo semelhante. Isso é devido ao consumo alimentar também ter sido semelhante entre todos os grupos e as dietas serem formuladas para apresentarem o mesmo teor de ferro. Portanto, o consumo alimentar, ganho de peso e consumo de ferro, por não terem diferido entre os grupos, não afetaram supostamente as variáveis bioquímicas e a biodisponibilidade de ferro.

#### 6.4.2 Biodisponibilidade de ferro dos feijões

A Tabela 7 demonstra os resultados de hemoglobina dos grupos experimentais no fim das fases de depleção e repleção, assim como o ganho de hemoglobina.

Tabela 7. Hemoglobina (Hb) dos grupos experimentais ao final das fases de depleção e repleção e ganho de hemoglobina.

Grupos	Hb Depleção (g/dL)	Hb Repleção (g/dL)	Ganho de Hb (g/dL)
<b>SF</b>	7,93 ± 0,80 <sup>a</sup>	9,56 ± 2,34 <sup>a</sup>	1,63 ± 1,84 <sup>a</sup>
<b>NC</b>	7,96 ± 0,79 <sup>a</sup>	9,26 ± 1,52 <sup>a</sup>	1,30 ± 1,52 <sup>a</sup>
<b>NG</b>	7,99 ± 0,74 <sup>a</sup>	9,22 ± 1,27 <sup>a</sup>	1,23 ± 1,01 <sup>a</sup>
<b>TC</b>	7,99 ± 0,70 <sup>a</sup>	9,60 ± 0,50 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,86 <sup>a</sup>
<b>TG</b>	7,99 ± 0,71 <sup>a</sup>	9,14 ± 1,15 <sup>a</sup>	1,14 ± 1,12 <sup>a</sup>

Dados expressos em média e desvio padrão (n=8). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferiu entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). SF= Sulfato ferroso, NC= Nova Era Cozido, NG= Nova Era Germinado, TC= Tumucumaque Cozido, TG= Tumucumaque Germinado.

Verifica-se em todos os grupos experimentais, no fim da fase de depleção, níveis semelhantes de hemoglobina, não apresentando diferença estatística. Este resultado era o esperado, uma vez que os animais foram distribuídos nos grupos de maneira que a concentração de hemoglobina fosse o mais próximo possível, para garantir que todos os grupos iniciassem a fase de repleção com as condições fisiológicas semelhantes.

Observando os níveis de hemoglobina no fim da fase de depleção, confirma-se a eficiência dessa fase em provocar anemia ferropriva nos animais, uma vez que níveis de hemoglobina abaixo de 12,0 g/dL em ratos são valores considerados para anemia (FIOCRUZ, 2005).

Em relação ao fim da fase de repleção, em todos os grupos experimentais houve aumento dos níveis de hemoglobina, conforme esperado, devido à oferta de dietas experimentais contendo o ferro. Os grupos não alcançaram valores de hemoglobina para serem classificados como não anêmicos, isso pode ser devido ao curto período analisado de apenas 14 dias de oferta de dietas contendo ferro.

Na biofortificação de alimentos, a metodologia de depleção/repleção é útil para fornecer estimativas qualitativas da biodisponibilidade de ferro dos principais acessos classificados como genótipos promissores de alimentos biofortificados, reduzindo assim o número de genótipos que teriam que ser testados em humanos (WELCH et al., 2000; FORBES et al., 1989).

Foi calculada a Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE) e Valor Biológico Relativo (RBV), conforme Tabela 8.

Tabela 8. Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE) e Valor Biológico Relativo (RBV) dos grupos experimentais.

Grupos	HRE (%)	RBV
SF	60,88 ± 30,31 <sup>a</sup>	100,00 ± 49,78 <sup>a</sup>
NC	47,82 ± 12,46 <sup>a</sup>	78,54 ± 20,47 <sup>a</sup>
NG	50,32 ± 16,71 <sup>a</sup>	82,65 ± 27,44 <sup>a</sup>
TC	49,95 ± 11,88 <sup>a</sup>	82,05 ± 19,52 <sup>a</sup>
TG	43,49 ± 16,88 <sup>a</sup>	71,44 ± 27,73 <sup>a</sup>

Dados expressos em média e desvio padrão (n=8). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferiu entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). SF= Sulfato ferroso, NC= Nova Era Cozido, NG= Nova Era Germinado, TC= Tumucumaque Cozido, TG= Tumucumaque Germinado.

A biodisponibilidade de ferro pode ser inferida pelo teor de ferro incorporado à hemoglobina durante a fase de repleção, assim, foi calculado a Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE), que não apresentou diferença (p>0,05) entre os grupos experimentais.

Em relação ao Valor Biológico Relativo (RBV), os grupos não apresentaram diferença (p>0,05) entre eles. O RBV reflete a eficiência que o ferro é utilizado pelo organismo, assim, o sulfato ferroso é considerado 100% por ser considerado o padrão. Os grupos experimentais não apresentaram diferença estatística, porém todos apresentaram RBV satisfatórios, uma vez que apresentaram valores entre 71,44 e 82,65%, valores estes próximos de 100%.

Os parâmetros HRE e RBV não apresentaram diferença estatística entre os grupos, podemos concluir que tanto a germinação quanto o cozimento apresentam alta biodisponibilidade de ferro, uma vez que eles apresentaram valores semelhantes ao grupo controle (sulfato ferroso).

Tako et al. (2015) relataram que feijões biofortificados exibiram maior biodisponibilidade de ferro comparado aos cultivares convencionais no ensaio *in vivo*. Resultados diferentes foram encontrados no presente estudo, não apresentando diferença estatística entre o feijão biofortificado e o convencional, ambos comparáveis ao grupo controle.

Em relação aos tipos de processamento aplicados, a germinação não se destacou em relação ao cozimento, apresentando valores de biodisponibilidade de ferro semelhantes. Porém, os resultados do processo de germinação foram comparáveis ao grupo controle, demonstrando potencial positivo da germinação.

De acordo com os resultados do presente estudo, o melhoramento genético aumentando o teor de ferro no feijão, por si só, pode não refletir em aumento proporcional na sua biodisponibilidade, pois esta é também influenciada por outros fatores, como pela concentração de compostos inibidores da absorção, ou seja, os fatores antinutricionais e outros componentes da dieta.

No presente estudo, os resultados *in vivo* não corroboram com os *in vitro*, uma vez que o ensaio *in vitro* demonstrou uma maior bioacessibilidade de ferro nos grupos germinados ( $p \leq 0,05$ ), podendo prever uma maior biodisponibilidade *in vivo*, porém não foram observados esses resultados.

#### 6.4.3 Hepcidina sérica

Os resultados referentes aos valores obtidos dos níveis de Hepcidina dosados no sangue dos animais dos grupos experimentais são apresentados na Figura 5.

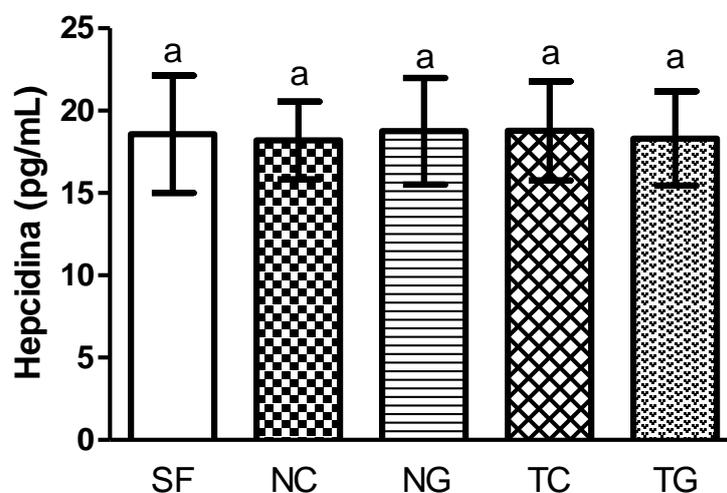


Figura 5. Hepcidina sérica dos grupos experimentais. Dados expressos em média e desvio padrão ( $n=8$ ). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. SF= Sulfato ferroso, NC= Nova Era Cozido, NG= Nova Era Germinado, TC= Tumucumaque.

Comparando os níveis de hepcidina obtidos entre os grupos experimentais, observa-se semelhança estatística entre eles ( $p \geq 0,05$ ). Estes valores semelhantes entre os grupos, inclusive o grupo controle, demonstra que essa proteína envolvida no metabolismo do ferro não estava alterada após a recuperação da anemia dos

animais. Isto já era o esperado, uma vez que todos os grupos recuperaram níveis semelhantes de hemoglobina.

Ainda não há um valor de referência para os níveis de hepcidina, havendo valores diferentes encontrados em pesquisas. Marciano et al. (2015) obtiveram níveis dessa proteína de 3,69 pg/mL para ratos que recuperaram da anemia ferropriva. Kong et al. (2014) encontraram diferença entre sexo, apresentando os ratos fêmeas maior teor que os machos.

A hepcidina é um hormônio regulador de ferro e sua produção é definida de acordo com as concentrações e estoques de ferro, ou seja, ela é denominada um regulador negativo do metabolismo do ferro. Quando se tem uma condição de anemia, com concentrações de ferro baixas, há menos liberação de hepcidina, que vai ocasionar a exposição da ferroportina na membrana plasmática, gerando uma exportação do mineral para o plasma. Em resposta a um aumento de ferro, há paralelamente um aumento da liberação da hepcidina, esta se liga à ferroportina, induzindo sua internalização ou degradação, assim, o ferro liberado diminui progressivamente, mantendo o equilíbrio (LEMOS et al., 2010; GANZ; NEMETH, 2011; ZHANG et al., 2011; NICOLAS et al., 2002).

Níveis reduzidos de hepcidina podem indicar anemia ferropriva, uma vez que há uma grande associação entre baixa expressão de hepcidina e anemia por deficiência de ferro. Estudos comprovam que este hormônio tem-se mostrado um potente marcador para a detecção de anemia ferropriva (LEMOS et al., 2010; ZHANG et al., 2011). Assim, o doseamento da hepcidina sérica poderá ser usado no futuro como uma ferramenta importante no diagnóstico, classificação e monitoramento de indivíduos com patologias relacionadas ao metabolismo do ferro.

## 7 CONCLUSÃO

A germinação não alterou os fatores antinutricionais, como taninos e fitatos, comparado com o cozimento. O cultivar biofortificado apresentou maiores teores de proteínas e cinzas, e menores de lipídios. Os feijões germinados obtiveram maior conteúdo de fenólicos totais. O percentual de biofortificação com ferro foi de 46,8%, não apresentando diferença no teor desse mineral entre germinação e cozimento.

A bioacessibilidade *in vitro* de ferro dos feijões que foram germinados apresentaram valores superiores, tanto o convencional quanto o biofortificado, em comparação com o cozimento, demonstrando a eficiência da germinação em liberar o ferro da matriz alimentar do feijão.

O feijão biofortificado que foi germinado pode ser considerado um veículo promissor de ferro biodisponível, uma vez que sua biodisponibilidade foi comparável à do sulfato ferroso pelo método *in vivo*.

O maior conteúdo de fenólicos totais e outros fatores não analisados podem ter afetado a biodisponibilidade de ferro, uma vez que a germinação promoveu maior bioacessibilidade, porém essa liberação do ferro da matriz alimentar não repercutiu na maior absorção e/ou utilização do ferro para a síntese de hemoglobina.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOWSKI, S. W.; WAEBER, G.; GASSNER, C.; BUSER, A.; FREY, B. M.; FAVRAT, B.; TISSOT, J. D. Physiology of Iron Metabolism. **Transfusion Medicine and Hemoteraphy**, v. 41, p. 213-221, 2014.
- AKOND, G. M.; GRAWFORD, H.; BERTHOLD, J.; TALUKDER, Z. I.; HOSSAIN, K. Minerals (Zn, Fe, Ca and Mg) and antinutrient (phytic acid) constituents in common bean. **American Journal of Food Technology**, New York, v. 6, n. 3, p. 235-243, 2011.
- ALMEIDA, D. T.; GREINER, R.; FURTUNADO, D. M. N.; TRIGUEIRO, I. N. S.; ARAUJO, M. P. N. Content of some antinutritional factors in bean cultivars frequently consumed in Brazil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 243–249, 2008.
- AMARANTE, M. K.; OTIGOSSA, A.; SUEIRO, A. C.; DE OLIVEIRA, C. E.; DE CARVALHO, S. R. Anemia Ferropriva: uma visão atualizada. **Biosaúde**, Londrina, v. 17, n. 1, 2015.
- AOAC - Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. 18<sup>th</sup> ed. Maryland, 2005.
- AOAC - Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. 16<sup>th</sup> ed. Washington, D.C., 1998.
- AOAC, Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. Washington D.C.: AOAC, v.2, 1997.
- AOAC, Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. Washington, DC, 1990.
- ASP, N. G.; CLAES, G. J.; HALLMER, H.; SILJESTRON, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 476-482, 1983.
- BARROS, N. V. dos A.; LEAL, M. J. B.; ARAÚJO, M. A. da M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. dos R. **Composição química de cultivares biofortificados de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Congresso Nacional do Feijão-Caupi, Recife, 2013.
- BASSINELLO, P. Z.; CARVALHO, R. N.; ALMEIDA, R. P.; ARAÚJO, M. R.; COBUCCI, R. M. A. **Desenvolvimento de mistura para bolo com farinhas de quirera de arroz e bandinha de feijão**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Goiás. 8 p. (Embrapa Goiás. Comunicado Técnico, 193), 2010.
- BATISTA FILHO, M.; SOUZA, A. I.; MIGLIOLI, T. C.; SANTOS, M. C. Anemia e obesidade: um paradoxo da transição nutricional brasileira. **Caderneta de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 247-257, 2008.

BATISTA, K. A.; PRUDÊNCIO, S. H.; FERNANDES, K. F. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 286-290, 2010.

BAU, H. M.; VILLAUME, C.; NICOLAS, J. P.; MÉJEAN, L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 73, n. 1, p. 1-9, 1997.

BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Levels of nutritionally-important trace elements and macronutrients in edible leaves and grain of 27 nodulated cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes grown in the Upper West Region of Ghana. **Food Chemistry**, v. 125, p. 99-105, 2011.

BENEVIDES, C. M. de J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. **Nutrition Research**, v. 18, n. 3, p. 581-603, 1998.

BERNI, P. R. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Efeito da germinação e da sanitização sobre a composição centesimal, teor de fibras alimentares, fitato, taninos e disponibilidade de minerais em trigo. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 3, p. 407-420, 2011.

BEZERRA, M. A. F.; DE OLIVEIRA, F. S.; BEZERRA, F. T. C.; PEREIRA, W. E.; DA SILVA, S. A. Cultivo de feijão-caupi em Latossolos sob o efeito residual da adubação fosfatada. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2014.

BIGONHA, S. M. **Qualidade proteica e biodisponibilidade de ferro e zinco em feijões biofortificados**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Viçosa, 2013.

BIOFORT – Rede responsável pelo programa de biofortificação de alimentos no Brasil. Acesso em 15/03/2018 a. Disponível em: <http://biofort.com.br/resultados/>.

BIOFORT – Rede responsável pelo programa de biofortificação de alimentos no Brasil. Acesso em 15/03/2018 b. Disponível em: <https://biofort.com.br/rede-biofort/>.

BOGDAN, A. R.; MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, K.; TSUJI, Y. Regulators of Iron Homeostasis: New players in Metabolism, Cell Death, and Disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 274-286, 2016.

BONETT, L. P.; BAUMGARTNER, M. S. T.; KLEIN, A. C.; SILVA, L. I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, set/dez, 2007.

BOUIS, H. Enrichment of food staples through plant breeding: A new strategy for fighting micronutrient malnutrition. **Nutrition Reviews**, v. 16, p. 701-704, 2000.

BOUIS, H. E.; HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B.; MEENAKSHI, J. V.; PFEIFFER, W. H. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 32, n 1 suppl., p. S31-S40, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Carências de micronutrientes**. Cadernos de Atenção Básica - nº 20 Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília - DF, 2007.

BRESSAMI, R.; MORA, D. R.; FLORES, R.; GOMEZ-BRENES, R. Evaluación de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles em frijol crudo y cocido, y efecto que estos provocan en la digestibilidad de la proteína. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 41, n. 4, p. 570 – 583, 1991.

BRIGIDE, P.; CANNIATT-BRAZACA, S. G.; SILVA, M. O. Nutritional characteristics of biofortified common beans. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 493-500, 2014.

CÁCERES, P. J.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; AMIGO, L.; FRIAS, J. Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. **Food Chemistry**, v. 152, p. 407–414, 2014.

CASCIO, M. J.; DELOUGHERY, T. G. Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. **Medical Clinics of North America**, v. 101, p. 263–284, 2017.

CAMASCHELLA, C., M., D. Iron-deficiency anemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 19, p. 1832-1843, 2015.

CAMPIONA, B.; GLAHNB, R. P.; TAVAC, A.; PERRONED, D.; DORIAE, E.; SPARVOLIF, F.; CECOTTIC, R.; DANIA, V.; NIELSENE, E. Genetic reduction of antinutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed, increases nutrients and *in vitro* iron bioavailability without depressing main agronomic traits. **Field Crops Research**, v. 141, p. 27–37, 2013.

CARNEIRO, J. C. S.; MINIM, V. P. R.; SOUZA JÚNIOR, M. M.; CARNEIRO, J. E. S.; ARAÚJO, G. A. A. Perfil sensorial e aceitabilidade de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 18-24, 2005.

CARVALHO, J. L. V. de; NUTTI, M. **Biofortificação de produtos agrícolas para nutrição humana**. Anais da 64ª Reunião Anual da SBPC. São Luís, MA. Julho, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 5, Safra 2017/18. Sétimo Levantamento, Brasília, p. 1-139,

Abril de 2018.

COSTA, O. A.; QUEIROZ, K. S.; HELBIG, E.; REIS, S. M. P. M.; CARRARO, F. O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 3, p. 276 – 283, 2001.

DAVIDSSON, L.; DIMITRIOU, T.; WALCZYK, T.; HURRELL, R. F. Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (*Pisum sativum*)-protein isolate: the effect of phytic acid and ascorbic acid. **British Journal of Nutrition**, Switzerland, v. 85, p. 59 - 63, 2001.

DEICHER, R.; HÖRL, W. H. New insights into the regulation of iron homeostasis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, p. 301-309, 2006.

DELFINO, R. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade protéica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 308-312, 2010.

DEMAEYER, E.; ADIELS-TEGMAN, M. The prevalence of anaemia in the world. **World Health Stat Q**, v. 38, n. 3, p. 302-16, 1985.

DÍAZ, A. M.; CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, v. 43, p. 595–601, 2010.

DONANGELO, C. M.; TRUGO, L. C.; TRUGO, N. M. F.; EGGUM, B. O. Effect of germination of legume seeds on chemical composition and on protein and energy utilization in rats. **Food Chemistry**, v. 53, p. 23-27, 1995.

DUEÑAS, M.; SARMENTO, T.; AGUILERA, Y.; BENITEZ, V.; MOLLÁ, E.; ESTEBAN, R. M.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 72-78, 2016.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produtos, processos e Serviços – Cultivar. Feijão-caupi Tumucumaque. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/meio-norte/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/435/feijao-caupi-brs-tumucumaque>>. Acesso em 31/03/ 2018a.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produtos, processos e Serviços – Cultivar. Feijão-caupi Nova Era. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/meio-norte/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1451/feijao-caupi-brs-novaera>>. Acesso em 31/03/2018b.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agência de Informação Embrapa: Feijão. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/Abertura.html>>. Acesso em

17/04/2018c.

FERNANDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LERIDA, I.; PEREZ-GALVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition research**, v. 29, n. 11, p. 751-760, 2009.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FIORI, C. B. **Efeito da germinação de grãos e temperatura de processamento na composição nutricional de dietas crudívoras**. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Dissertação (Mestrado), Piracicaba, 2014.

FREIRE FILHO, R. F.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. de M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. da R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético e desafios**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Meio Norte), Teresina, 2011.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

FORBES, A. L.; ARNAUD, M. J.; CHICHESTER, C. O.; COOK, J. D.; HARRISON, B. N.; HURRELL, R. F. Comparison of *in vitro*, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 225-238, 1989.

FORDHAM, J. R.; WELLS, C. E.; CHEN, L. H. Sprouting of seed and nutrient composition of seeds and sprouts. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 552-554, 1975.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador (2005).

GANZ, T.; NEMETH, E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. **Hematology, The Education Program**, v. 2011, n. 1, p. 538-542, 2011.

GENC, Y.; HUMPHRIES, J. M.; LYONS, G. H.; GRAHAM, R. H. Exploiting genotype variation in plant nutrient accumulation to alleviate micronutrient deficiency in populations. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, p. 319 – 324, 2005.

GLAHN, R. P.; TAKO, E.; CICHY, K.; WIESINGER, J. The cotyledon cell wall and intracellular matrix are factors that limit iron bioavailability of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Food Funct**, v. 7, p. 3193–3200, 2016.

GOYCOOLEA, F.; MEJIA, E. G.; BARRÓN, J. M.; VALENCIA, M. E. Efecto de los tratamientos caseros en la preparación de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el

contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Venezuela, v. 40, n. 2, p. 263-274, 1993.

GHAVIDEL, R. A.; PRAKASH, J. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1292-1299, 2007.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Campinas – SP, v. 32, n. 2, p. 8-17, 2010.

HAO, J.; WU, T.; LI, H.; WANG, W.; LIU, H. Dual effects of slightly acid electrolyzed water (SAEW) treatment on the accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and rutin in germinated buckwheat. **Food Chemistry**, v. 201, p. 87–93, 2016.

HARO-VICENTE, J. F.; MARTÍNEZ-GRACIÁ, C.; ROS, G. Optimisation of in vitro measurement of available iron from different fortificants in citric fruit juices. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 639-648, 2006.

HUBER, K. **Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum e seus efeitos na digestibilidade proteica**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HUNG, P. V.; MAEDA, T.; YAMAMOTO, S.; MORITA, N. Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 667-672, 2012.

HU, Y.; GHENG, Z.; HELLER, L. I.; KRASNOFF, S. B.; GLAHN, R. P.; WELCH, R. M. Kaempferol in Red and Pinto Bean Seed (*Phaseolus vulgaris* L.) Coats Inhibits Iron Bioavailability Using an in Vitro Digestion/Human Caco-2 Cell Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 9254-9261, 2006.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCIEMENTS, D. J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 01-12, 2001.

ISRAR, B.; FRAZIER, R. A.; GORDON, M. H. Effects of phytate and minerals on the bioavailability of oxalate from food. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1690–1693, 2013.

KASSEBAUM, N. J.; JASRASARIA, R.; NAGHAVI, M.; WULF, S. K.; JOHNS, N.; LOZANO, R.; REGAN, M.; WEATHERALL, D.; CHOU, D.P.; EISELE, T. P.; FLAXMAN, S. R.; PULLAN, R. L.; BROOKR, S. J.; MURRAY, C. J. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 615- 624, 2014.

KAUR, S.; SHARMA, S.; DAR, B. N.; SINGH, B. Optimization of process for

reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 5, 2011.

KIM, H. Y.; HWANG, I. G.; KIM, T. M.; WOO, K. S.; PARK, D. S.; KIM, J. H.; JEONG, H. S. Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 288–293, 2012.

KOEHLER, P.; HARTMANN, G.; WIESER, H.; RYCHLIK, M. Changes of folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.4678–4683, 2007.

KONG, W. N.; NIU, Q. M.; GE, L.; ZHANG, N.; YAN, S. F.; CHEN, W. B.; CHANG, Y. Z.; ZHAO, S. E. Sex differences in iron status and hepcidin expression in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 160, p. 258 – 267, 2014.

LA FRANO, M. R.; MOURA, F. F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B. J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 5, p. 289 – 307, 2014.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996.

LATTA, M., ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.

LEAL, A. S.; GONÇALVES, C. G.; VIEIRA, I. F. R.; CUNHA, M. R. R.; GOMES, T. C. B.; MARQUES, F. R. Avaliação da concentração de minerais e dos fatores antinutricionais fitato e oxalato em multimisturas da Região Metropolitana de Belo Horizonte/MG. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 35, n. 2, p. 39-52, 2010.

LEE, C. K.; KARUNANITHY, R. Effect of germination on the chemical composition of Glycine and Phaseolus Beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 51, n. 4, p. 437-445, 1990.

LEITÃO, W. S.; OLIVEIRA, E. Anemia ferropriva infantil no Brasil: uma revisão sistemática de literatura. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo de Conhecimento**, v. 5, p. 24 – 36, 2016.

LEMOS, A. dos R.; ISMAEL, L. A. S.; BOATO, C. C. M.; BORGES, M. T. F.; RONDÓ, P. H. de C. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por deficiência de ferro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 5, p. 596-599, 2010.

LESTIENNE, I.; ICARD-VERNIERE, C.; MOUQUET, C.; PICQ, C.; TRECHE, S. Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 421-425, 2005.

LIMA, A. L. **Produção de brotos de fabaceae para o consumo humano.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Pós-graduação em Ciência dos alimentos, Lavras, Minas Gerais, 2016.

LOZOFF, B.; BRITTENHAM, G. M.; WOLF, A. W.; MCCLISH, D. K.; KUHNERT, P. M.; JIMENEZ, E.; JIMENEZ, R.; MORA, L. A.; GOMEZ, I.; KRAUSKOPH, D. Iron deficiency anemia and iron therapy effects on infant developmental test performance. **Pediatrics**, v. 79, n. 6, p. 981-95, 1987.

LUNG'AHU, M. G.; GLAHN, R. P. Use of white beans instead of red beans may improve iron bioavailability from a Tanzanian complementary food mixture. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 80, n. 1, p. 24-31, 2010.

MARCIANO, R.; SANTAMARINA, A. B.; SANTANA, A. A.; SILVA, M. L. C.; AMANCIO, O. M. S.; NASCIMENTO, C. M. P. O.; OYAMA, L. M.; MORAES, M. B. Effects of prebiotic supplementation on the expression of proteins regulating iron absorption in anaemic growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 901 – 908, 2015.

MARQUEZI, M. **Características físico-químicas e avaliação das propriedades tecnológicas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2013.

MARTINEZ, A. P. C.; MARTINEZ, P. C. C.; SOUZA, M. C.; CANNIATTI BRAZACA, S. G. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 23-30, 2011.

MARTINEZ, P. C. C. **Efeito da radiação gama e do processo de germinação sobre as características nutricionais do feijão.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MEGÍAS, C.; YUST, M.; PEDROCHE, J.; LQUARI, H.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1928-1932, 2009.

MENACHO, L. M. P. **Influência do processo de germinação dos grãos de duas cultivares de soja BRS 133 e BRS 258 nos compostos bioativos da farinha integral de soja germinada.** 2009. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

MENDOZA-SÁNCHEZ, M.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; MERCADO-SILVA, E. M.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; REYNOSO-CAMACHO, R. Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. **Food Chemistry**, v. 212, p. 128–137, 2016.

MINGUITA, A. P. S.; CARVALHO, J. L. V.; SANTOS, J. O.; SILVA, E. S.; OLIVEIRA, E. M. Teor de ferro e zinco em massas alimentícias a base de mistura de farinha de trigo, farinha de arroz e farinha de feijão biofortificadas. **IV Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. João Pessoa, Paraíba, 2012.

MONTOYA, C. A.; LALLÈS, J. P.; BEEBE, S.; LATERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 443-449, 2010.

MOONGNGARM, A.; SAETUNG, N. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 782–788, 2010.

MOSTAFA, M. M.; RAHMA, E. H. Chemical and nutrition changes in soybean during germination. **Food Chemistry**, v. 23, p. 257-275, 1987.

MUBARAK, A. E. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. **Food Chemistry**, v. 89, p. 489-495, 2005.

NAKITTO, A. M.; MUYONGA, J. H.; NAKIMBUGWE, D. Effects of combined traditional processing methods on the nutritional quality of beans. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 3, pag. 233–241, 2015.

NESTEL, P.; BOUIS, H.; MEENAKSHI, J.V.; PFEIFFER, W. Biofortification of Staple Food Crops, Symposium: Food Fortification in Developing Countr, **The Journal of Nutrition**, p. 1064-1067, 2011.

NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; PORTEU, A. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidina. **PNAS**, v. 99, n. 7, p. 4596 – 4601, 2002.

NKUNDABOMBI, M. G.; NAKIMBUGWE, D.; MUYONGA, J. H. Effect of processing methods on nutritional, sensory, and physicochemical characteristics of biofortified bean flour. **Food Science & Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 384–397, 2016.

NOZELLA, E. F. **Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OLOGHOBO, A. D.; FETUGA, B. L. Effect of processing on the tripsin inhibitor, haemagglutinin, tannic acid and phytic acid contents of seeds of ten cowpea varieties. **Tropical Agriculture**, v. 61, n. 4, p. 261-264, 1984.

OOMAH, B. D.; CORBE, A.; BALASUBRAMANIAN, P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L) hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 14, p. 8225-8230, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad. **Sistema de Información**

**Nutricional sobre Vitaminas y Minerales**, 2011.

PINTO, J. V. **Propriedades físicas, químicas, nutricionais e tecnológicas de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes grupos de cor**. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2016.

PRICE, M. L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, USA, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.

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

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, J. R. 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, p.1939–195, 1993.

RICHARD, S. E.; THOMPSON, L. V. **Interactions and biological effects of phytic acid**. In: Shahidi F, editor. Antinutrients and phytochemicals in food. ACS symposium series, n 662. Washington (DC): American Chemical Society. Chapter 17: 294-312, 1997.

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

RODRIGUES, L. P.; JORGE, S. R. P. F. Deficiência de ferro na mulher adulta. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, p. 49-52. 2010.

RODRIGUES, E. V.; DAMASCENO-SILVA, K. J.; ROCHA, M. M.; BASTOS, E. A. Diallelic analysis to obtain cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) populations tolerant to water deficit. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2015.

ROSS, M. W.; WILLIAM, A. H. T.; STEVEN, B.; CHENG, Z. Genetic Selection for Enhanced Bioavailable Levels of Iron in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3576 - 3580, 2000.

SALTZMAN, A.; BIROL, E.; BOUIS, H. E. Biofortification: progress toward a more nourishing future. **Global Food Security**, v. 2, p. 9 – 17, 2013.

SÁNCHEZ, M. M.; GONZÁLEZ, R. G. G.; TOSTADO, E. C.; SILVA, E. M. M.; GALLEGOS, J. A. A.; GUZMÁN, N. E. R.; CAMACHO, R. R. Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. **Food Chemistry**, v. 212, p.

128–137, 2016.

SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; REDDY, N. R. Effects of germination on proteins, daffinose, oligosacharides, and nutritional factores in the great Northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.) **Journal of Food Science**, v. 48, n. 6, p. 1796 – 1800, 1983.

SILVA, M. R.; SILVA, A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 5-19, 1999.

SILVA, F. L. **Avaliação físico-química em grãos de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L. in natura e germinado**. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SINGH, B.; ARORA, S.; AGRAWAL, P.; GUPTA, S. K. Hepcidin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. **Clinica Chimica Acta**. Elsevier. India, v. 12, n. 412, p. 823-830, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. **Meth Enzymology**. p. 152-178, 1999.

SOUZA, A. T. Determinação da anemia por deficiência de ferro em crianças de 04 meses e 04 anos associada a enteroparasitoses. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 1, p. 59 – 63, 2011.

STANLEY, D. W.; AGUILLERA, J. M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes – The influence of structure and composition. **Journal of Food Biochemistry**, v. 9. n. 4, p. 277-323, 1985.

STEVENS, G. A.; FINUCANE, M. M.; DE-REGIL, L. M.; PACIOREK, C. J.; FLAXMAN, S. R.; BRANCA, F.; PENA-ROSAS, J. P.; BHUTTA, Z. A.; EZZATI, M. Nutrition Impact Model Study Group (Anaemia). Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995–2011: a systematic analysis of population-representative data. **Lancet Glob Health**, v. 1, p. 16–25, 2013.

TAKO, E.; GLAHN, R. P.; LAPARRA, J. M.; WELCH, R. M.; LEI, X.; KELLY, J. D.; RUTZKE, M. A.; MILLER, D. D. Iron and Zinc Bioavailabilities to Pigs from Red and White Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Are Similar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3134–3140, 2010.

TAKO, E.; REED, S.; ANANDARAMAN, A.; BEEBE, S. E.; HART, J. J.; GLAHN, R. P. Studies of Cream Seeded Carioca Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from a Rwandan Efficacy Trial: *In Vitro* and *In Vivo* Screening Tools Reflect Human Studies and Predict Beneficial Results from Iron Biofortified Beans. **PLOS ONE**, v. 18, p. 02-15, 2015.

TAKO, E.; BAR, H.; GLAHN, R. P. The Combined Application of the Caco-2 Cell Bioassay Coupled with *In Vivo* (*Gallus gallus*) Feeding Trial Represents an Effective Approach to Predicting Fe Bioavailability in Humans. **Nutrients**, v. 8, n. 732, 2016.

TROESCH, B.; EGLI, I.; ZEDER, C.; HURRELL, R. F. ; PEE, S. ; ZIMMERMANN, M. B. Optimization of a phytase-containing micronutrient powder with low amounts of highly bioavailable iron for in-home fortification of complementary foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p.539 - 544, 2009.

VALDÉS, S. T. **O efeito de genótipos de feijão e das formas usuais de preparo sobre a atividade antioxidante e a composição nutricional**. 2010. 103p. Dissertação (Mestrado em Nutrição), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

VÁZ-TOSTES, M. G.; VEREDIANO, T. A.; MEJIA, E. G.; COSTA, N. M. B. Evaluation of iron and zinc bioavailability of beans targeted for biofortification using *in vitro* and *in vivo* models and their effect on the nutritional status of preschool children. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1326–1332, 2016.

VIEIRA, C.; DE PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2 ed, Atual, Viçosa, 2006.

WEI, Y.; SHOHAG, M. J. I.; YING, F.; YANG, X.; WU, C.; WANG, Y. Effect of ferrous sulfate fortification in germinated brown rice on seed iron concentration and bioavailability. **Food chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1952-1958, 2013.

WELCH, R. M; HOUSE, W. A; BEEBE, S.; CHENG, Z. Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal Agriculture Food Chemistre**, v. 48, p. 3576–3580, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level. World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention, Division of Nutrition and Physical Activity International Micronutrient Malnutrition Prevention and Control Program- Geneva, Switzerland, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva, 2001.

WONGSIRI, S.; OHSHIMA, T.; DUANGMAL, K. Chemical composition, amino acid profile and antioxidant activities of germinated mung beans (*Vigna radiata*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1956-1964, 2015.

XIONG, H.; SHI, A.; MOU, B.; QIN, J.; MOTES, D.; LU, W.; MA, J.; WENG, Y.; YANG, W.; WU, D. Genetic Diversity and Population Structure of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.

YAO, Y.; YANG, X.; TIAN, J.; LIU, C.; CHENG, X.; REN, G. Antioxidant and Antidiabetic Activities of Black Mung Bean (*Vigna radiata* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 34, p. 8104–8109, 2013.

ZHANG, D. L.; SENEAL, T.; GHOSH, M. C.; OLLIVIERRE-WILSON, H.; TU, T.; ROUAULT, T. A. Hpcidin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. **Blood Journal**, v. 118, n. 10, p. 2868-2877, 2011.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.



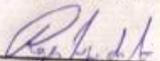
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

# CERTIFICADO

**Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da Biodisponibilidade de Ferro e sua interação com a vitamina A em alimentos biofortificados", Protocolo nº.72/2016, sob a responsabilidade de Neuza Maria Brunoro Costa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 07-04-2017.**

Vigência do Projeto	Início: Agosto/2017 Término: Fevereiro/2018
Espécie/Linhagem	Ratos <i>Wistar</i>
Nº de Animais	Experimento Piloto: 0 Experimental: 216 Total: 216
Peso/Idade	Peso: 50 a 60 gramas Idade: 21 dias
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 07 de abril de 2017.

  
Prof. Roger Lyrio dos Santos  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/CCS/UFES