



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
FRAÇÕES PROTEICAS DO FEIJÃO COMUM
(*Phaseolus vulgaris*) CULTIVAR PÉROLA**

JULIANA VILA VERDE RIBEIRO

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

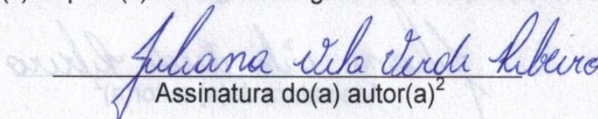
Nome completo do autor: Juliana Vila Verde Ribeiro

Título do trabalho: Estudo das atividades biológicas de frações proteicas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Pérola

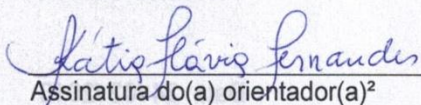
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 24 /02 /2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

JULIANA VILA VERDE RIBEIRO

**ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
FRAÇÕES PROTEICAS DO FEIJÃO COMUM
(*Phaseolus vulgaris*) CULTIVAR PÉROLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientador: Prof. Dr. Kátia Flávia Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Karla de Aleluia Batista

Goiânia
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

vila verde ribeiro , Juliana

Estudo das atividades biológicas de frações proteicas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Pérola [manuscrito] / Juliana vila verde ribeiro . - 2017.

XCVII, 97 f.: il.

Orientador: Profa. Katia Flávia Fernandes; co-orientadora Karla de aleluia Batista.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. feijão. 2. bioatividade. 3. atividade quelante. 4. autoclavagem. 5. absorção. I. Flávia Fernandes, Katia , orient. II. Título.

CDU 577.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 460**

2 Aos trinta dias do mês de junho do ano de dois mil e dezessete, às catorze
3 horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade
4 Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Profa.
5 Dra. Kátia Flávia Fernandes, Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuino e Prof.
6 Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio para, em sessão pública presidida pela
7 primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de dissertação
8 intitulada "Estudo das atividades biológicas de frações proteicas do feijão
9 comum (*Phaseolus vulgaris*) Cultivar Pérola", em nível de mestrado, área de
10 concentração em Bioquímica e Genética, de autoria de **Juliana Vila Verde**
11 **Ribeiro**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
12 Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente, que fez a
13 apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida
14 à autora da dissertação que em cerca de 30 minutos procedeu à
15 apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da
16 banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial.
17 Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-
18 se em vista o que consta na Resolução nº1340 de 2015 do Conselho de
19 Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa
20 de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi aprovada,
21 considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção
22 do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás.
23 A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da
24 dissertação na Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas
25 pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa.
26 Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 51 minutos,
27 encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato César Rodrigues,
28 Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

29 Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata
30 que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca
31 examinadora em três vias de igual teor.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

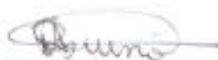
46

47


Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes

Presidente da Banca

Universidade Federal de Goiás



Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuino

Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio

Universidade Federal de Goiás

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram, auxiliaram e torceram por mais esta conquista.

AGRADECIMENTO

À deus em primeiro lugar, por estar sempre presente ofertando força, bênçãos e persistência para continuar nesta estrada acadêmica.

Aos meus pais Sandra Vila Verde e Julio Damasco, que me apoiaram e incentivaram, e me deram carinho para concluir esta etapa.

À minha orientadora Kátia Flávia Fernandes que foi paciente, transmitiu o seu conhecimento e orientou com sabedoria. Agradeço por ter sido mais do que uma orientadora, uma amiga e conselheira que sabe ensinar com amor e aconselhar sobre diversas adversidades da vida, e a persistir em momentos difíceis.

À minha co-orientadora Karla de Aleluia Batista que me passou conhecimentos importantes em relação à bioquímica e a pesquisa.

Ao professor Carlos Henrique Xavier por me acolher em seu laboratório para desenvolver parte deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de química de polímeros Viviane, Mauricio, Renata, Ladyslène, Marcos, Bruna e Erika que me apoiaram, ajudaram e deram força para realizar este trabalho.

Às minhas amigas Rebeca, Ana Karla e Vanessa que deram apoio e compreensão nesta fase.

“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem-mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.”

Albert Eistein

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 O FEIJÃO.....	21
2.2 EFEITO <i>HARD-TO-COOK</i> (HTC).....	22
2.3 PROCESSO DE AUTOCLAVAGEM.....	26
2.4 FATORES ANTINUTRICIONAIS.....	27
2.5 PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DE FEIJÃO.....	29
2.6 ANTIOXIDANTES.....	32
2.7 COMPLEXOS QUELANTES.....	33
2.8 IMPORTÂNCIA DO FERRO E DO COBRE.....	34
2.9 METABOLISMO DE FERRO.....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	38
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 OBEJTIVOS GERAIS.....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1 PREPARO DA AMOSTRA.....	41
5.1.1 MATERIAL.....	41
5.1.2 OBTENÇÃO DA FARINHA DO FEIJÃO COMUM.....	41
5.2 EXTRAÇÕES DAS FRAÇÕES PROTEICAS.....	41
5.2.1 MÉTODO 1: EXTRAÇÃO POR ACETONITRILA/ÁGUA/ÁCIDO FÓRMICO.....	42
5.2.2 MÉTODO 2: EXTRAÇÃO POR ACETATO DE SÓDIO.....	42
5.2.3 MÉTODO 3: EXTRAÇÃO POR BICARBONATO DE AMÔNIO.....	42
5.2.4 MÉTODO 4: EXTRAÇÃO POR SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA.....	43

5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	43
5.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	43
5.5 TESTE DE INIBIDORES DE ENZIMAS	44
5.5.1 ATIVIDADE DE INIBIDOR DE TRIPSINA.....	44
5.5.2 ATIVIDADE DE INIBIDOR DE α -AMILASE	44
5.6 FRACIONAMENTO PROTEICO.....	45
5.7 TRATAMENTO TÉRMICO DAS FRAÇÕES PROTEICAS.....	45
5.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM DPPH	46
5.9 ATIVIDADES QUELANTES	46
5.9.1 ATIVIDADE QUELANTE DE COBRE	46
5.9.2 ATIVIDADE QUELANTE DE FERRO	47
5.10 CAPACIDADE DE QUELANTE DE COBRE E FERRO	48
5.11 PREPARO DO COMPLEXO PEPTÍDEO-METÁLICO	48
5.11.1 COMPLEXO COBRE- PEPTÍDEO.....	48
5.11.2 COMPLEXO FERRO-PEPTÍDEO.....	49
5.12 ESTABILIDADE DO COMPLEXO PEPTÍDEO-METÁLICO ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS.....	49
5.13 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	50
5.13.1 ANIMAIS	50
5.13.2 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM URINA E FEZES.....	52
5.13.3 ABSORÇÃO APARENTE	53
5.13.4 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM ÓRGÃOS.....	53
5.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
6.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	55
6.2 GEL DE ELETROFOROSE SDS-PAGE	57
6.3. ATIVIDADES QUELANTES.....	58
6.3.1 ATIVIDADE QUELANTE DE COBRE	59
6.3.2 ATIVIDADE QUELANTE DE FERRO	61
6.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	64
6.5 ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	66
6.6 TESTES DE INIBIDORES DE ENZIMAS.....	66
6.7 FRACIONAMENTO PROTÉICO.....	69

6.8 CAPACIDADE DE QUELAR COBRE E FERRO POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PEPTÍDEOS.....	73
6.9 ESTABILIDADE DO COMPLEXO PEPTIDEO-METÁLICO ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS.....	76
6.10 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	80
6.10.1 QUANTIDADE DE INGESTA E EXCREÇÃO DE FERRO.....	80
6.10.2 ABSORÇÃO APARENTE	83
6.10.3 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM ÓRGÃOS.....	84
7. CONCLUSÃO	86
8. REFERÊNCIAS	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HTC: *Hard-to-cook*

Tyr: Tirosina

Trp: triptofano

Met: metionina

Lys: Lisina

Cys: Cisteína

Phe: Fenilalanina

Leu: Leucina

Pro: Prolina

His: Histidina

ETC: *Easy-to-cook*

AUT: Feijão endurecido autoclavado

E1: Extrato 1

E2: Extrato 2

E3: Extrato 3

E4: Extrato 4

SDS: Duodecilsulfato de sódio

TCA: Tricloroacético

UI: Unidade de inibição

UE: Unidade de Enzima

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ACN: Acetonitrila

AF: Ácido fórmico

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

ABTS: *2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*

ORAC: *Oxygen radical Absorbance Capacity*

ABAP: *2,2'-Azobis- (2-methylpropanoamidine) dihydrochloride*

FRAP: *Ferric reducing antioxidant power*

CAET: Capacidade antioxidante equivalente ao trolox

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagem do feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cultivar Pérola.....	19
Figura 2.	Imagem do feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cultivar Pérola endurecido.....	20
Figura 3.	Possíveis explicações do processo de endurecimento através da ação de algumas enzimas.....	22
Figura 4.	Representação da estrutura das principais proteínas do feijão comum.....	27
Figura 5.	Complexo quelante Ferro-peptídeo.....	31
Figura 6.	Mecanismo de absorção do ferro não heme e heme no enterócito.	34
Figura 7.	Microplacas evidenciando a atividade quelante de cobre.....	44
Figura 8.	Microplacas evidenciando a atividade quelante de ferro.....	45
Figura 9.	Gaiola metabólica para ratos.....	48
Figura 10.	Representação esquemática da sequência experimental.....	49
Figura 11.	Gel de eletroforese dos extratos obtidos empregando diferentes métodos de extração.....	55
Figura 12.	Teor de ferro eliminado nas principais vias de excreção (fezes e urinas).....	79
Figura 13.	Teor de ferro encontrado em tecido hepático e renal.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Quantificação de proteínas dos diferentes métodos de extração.....	52
Tabela 2.	Atividade Quelante de cobre dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração.....	57
Tabela 3.	Atividade quelante de ferro dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração.....	59
Tabela 4.	Atividade antioxidante dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração (TEAC/g).....	62
Tabela 5.	Teste de atividade de inibidores de enzimas presentes nos extratos obtidos pelo método de extração (E1).....	64
Tabela 6.	Quantificação de proteínas das frações proteicas (mg/mL).....	66
Tabela 7.	Atividade quelante de cobre das frações proteicas (%).....	68
Tabela 8.	Atividade Quelante de ferro das frações proteicas (%).....	68
Tabela 9.	Atividade Antioxidante das frações proteicas (TEAC/g ⁻¹ de proteína).....	69
Tabela10.	Quantidade de proteína necessário para quelar 100% dos íons de cobre..	71
Tabela 11	Quantidade de proteína necessário para quelar 100% dos íons de ferro....	72
Tabela 12	Estabilidade do complexo cobre-peptídeo após as condições gástricas.....	74
Tabela 13	Estabilidade do complexo ferro-peptídeo após as condições gástricas.....	75
Tabela 14	Média da quantidade de ingesta de ferro de cada grupo experimental.....	77
Tabela 15	Absorção aparente do ferro em animais experimentais.....	80

RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é considerado um alimento nutracêutico, por apresentar compostos bioativos, como por exemplo, os peptídeos. Estes peptídeos apresentam diversas atividades biológicas, tais como atividade quelante, antioxidante, anticancerígena, anti-hipertensiva e outras. Deste modo, este estudo objetivou avaliar a bioatividade de frações proteicas de feijão comum (*Phaseolus Vulgaris*) cultivar Pérola. Neste trabalho as farinhas obtidas dos grãos descascados de feijões recém-colhidos, endurecidos e endurecidos autoclavados foram avaliadas como fonte de peptídeos bioativos. Foram utilizadas quatro soluções para produção dos extratos: acetonitrila/ água/ ácido fórmico, acetato de sódio, bicarbonato de amônio e solubilização alcalina pH 8,0. Nos extratos e nas frações proteicas foram dosados o teor de proteínas, testes de atividade antioxidante com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), atividade quelante de ferro e de cobre. O extrato 1 foi escolhido para dar segmento às próximas etapas por apresentar maior bioatividade, deste modo ele foi submetido a fracionamento por ultrafiltração em membrana de 10 kDa, onde verificou sua bioatividade, resistência ao tratamento térmico e a estabilidade do complexo quelante formado a partir de ferro e peptídeo às condições gástricas. E foi avaliado o teor de fatores antinutricionais nos extratos submetidos ao tratamento térmico. Nestes testes o feijão autoclavado apresentou maiores atividades biológicas testadas do que os demais feijões. Nos testes com as frações proteicas observou-se que os peptídeos apresentaram bioatividade e foram resistentes ao tratamento térmico, e ao formar complexos quelantes são resistentes às condições gástricas. Observou-se que o tratamento térmico reduziu a quantidade de fatores antinutricionais. Os estudos *in vivo* evidenciaram que apesar do complexo ferro-peptídeo ser altamente estável às condições gástricas, o sistema não foi capaz de passar pela membrana dos enterócitos, sendo totalmente eliminado pelas fezes. Este trabalho contribuiu para ampliar o estudo dos compostos bioativos presentes em resíduos da agroindústria, com intuito de nortear o uso adequado e o melhor caminho para se explorar o potencial nutracêutico desta leguminosa.

Palavras-Chaves: feijão, bioatividade, atividade quelante, autoclavagem, absorção.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is considered a nutraceutical food, because it has bioactive compounds, such as peptides. These peptides have several biological activities, such as chelating, antioxidant, anticancer, antihypertensive and other activities. Thus, this study aimed to assess the bioactivity of protein fractions of common bean (*Phaseolus Vulgaris*) cultivar Pérola. In this work the flour obtained from the peeled beans freshly harvested beans, hardened and hardened autoclaved were evaluated as a source of bioactive peptides. Four solutions were used for the production of extracts: acetonitrile/water/formic acid, sodium acetate, Ammonium bicarbonate and alkaline pH 8.0 solubilization. In the extracts and the protein fractions were measured the protein content, antioxidant activity tests with DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), chelating activity of iron and copper. 1 extract was chosen to give the segment next steps for presenting greater bioactivity, thus he was submitted to fractionation by ultrafiltration in 10 kDa membrane, where verified your bioactivity, resistance to thermal treatment and the stability of the Chelation complex formed from iron and peptide gastric conditions. And was rated the content of antinutritional factors in the extracts submitted to heat treatment. These tests found that the bean plant presented greater biological activities tested than other beans. In tests with the protein fractions found that the peptides present bioactivity and are and resistant to heat treatment, and to form complex is resistant gastric conditions chelators. Observed that the thermal treatment reduces the amount of antinutritional factors. In vivo studies showed that despite being the iron complex-peptide to be stable gastric conditions, the system was not able to pass through the membrane of enterocytes, being totally eliminated by the feces. This work contributed to expand the study of bioactive compounds present in wastes from agro-industry, in order to guide the proper use and the best way to explore the nutraceutical potential of this legume.

Keywords: bioactivity, stability, autoclaving, hardened, absorption

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o contexto histórico do Brasil, o feijão é uma cultura antiga bastante utilizada na alimentação da população em áreas rurais e urbanas. Este alimento é mundialmente consumido por apresentar propriedades promotoras de saúde, uma vez que esta leguminosa é caracterizada por possuir proteínas, carboidratos complexos, compostos fenólicos, minerais e vitaminas (1-2).

O feijoeiro é uma cultura que apresenta 3 safras anuais, denominadas de safra das “águas” ou 1º safra, cujo plantio se dá nos meses de agosto a novembro; a safra da “seca” ou 2º safra, com o plantio nos meses de dezembro a abril e a safra de inverno ou 3º safra, que é plantada nos meses de abril a julho (3).

Apesar de ser uma cultura extremamente importante do ponto de vista econômico e nutricional, houve uma diminuição da área plantada de feijão comum no ano de 2016. Segundo dados da Conab (2016)⁽⁴⁾ houve uma redução de 7,5% na área plantada para a primeira safra, 3% para a segunda safra e 16,8% para a terceira safra, totalizando uma área plantada de 2.796,3 mil hectares. Essa redução do plantio do feijão decorreu de condições climáticas desfavoráveis que afetaram as plantações, como ausência de chuvas em algumas regiões, geadas na região sul e oscilações de temperaturas e umidade. Em Goiás, por exemplo, a produtividade de feijão no ano de 2016 teve um decréscimo de 5,6% em relação à safra 2014/15. A redução da produtividade se deu em consequência da dificuldade de irrigação nas plantações, uma vez que os abastecimentos de água nas barragens permaneceram muito baixos.

Por conta dos preços de mercado, problemas com as condições climáticas (capacidade hídrica e temperatura) e custo elevado de produção (energia, semente cara e escassa), vários agricultores estão desmotivados a plantar o feijão comum. A baixa produtividade diminui o repasse do produto às redes de supermercado e conseqüentemente o preço do feijão se eleva (4). Em função destas condições adversas, no ano de 2016 o feijão sofreu um aumento médio no preço de 167%.

Além do elevado preço do feijão comum, outro empasse enfrentado pelo consumidor é o endurecimento do grão. O seu armazenamento inadequado, com a temperatura acima de 25°C e a umidade acima de 65%, aumenta a velocidade do processo de endurecimento, que é também conhecido como efeito *hard-to-cook* (difícil de cozinhar). O efeito *hard-to-cook* (HTC) é um fenômeno em que as sementes não amolecem facilmente quando sujeitas a imersão em água, o tempo de cocção do grão aumenta, ocorrem alterações de textura e sabor e há uma redução do valor nutricional. Tais aspectos levam à rejeição do consumidor em relação a este produto (5-7).

Com relação ao valor nutricional do feijão HTC, comparando-se este ao feijão recém-colhido (*easy-to-cook* – ETC), sabe-se que ambos apresentam a mesmas quantidades de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais. No entanto, a biodisponibilidade dos nutrientes no grão HTC é baixa, uma vez que as alterações que ocorrem nestes grãos com a passar do tempo provocam a diminuição da digestibilidade de amido e proteínas (8).

O feijão HTC não é totalmente descartável. É possível utilizá-lo mediante o emprego de tecnologias, como por exemplo, a imersão dos grãos endurecidos em soluções salinas ou ainda submetendo os grãos a tratamentos térmicos (9). Uma das tecnologias que podem ser usadas para o tratamento de grãos HTC é a autoclavagem. Este método baseia-se em um processo térmico onde a combinação de pressão e calor úmido pode ocasionar a redução dos fatores antinutricionais e melhorar a digestibilidade de proteínas e carboidratos (10).

Nos últimos anos a indústria de alimentos voltou sua atenção aos alimentos que apresentem características ao mesmo tempo nutricionais e benéficas à saúde, os chamados alimentos nutracêuticos. As pesquisas nesta área se concentram em produtos naturais ricos em compostos bioativos. O feijão se enquadra neste requisito, uma vez que ele apresenta, polifenóis, amido resistente, oligossacarídeos e peptídeos (11). Dentre estes compostos bioativos presentes no feijão, os peptídeos se destacam por atuar como ligantes, inibidores ou biomarcadores, que podem ser utilizados com fins terapêuticos e medicinais (12).

Dentre as atividades biológicas que os peptídeos apresentam, destaca-se a capacidade que alguns peptídeos têm de se ligar com metais, podendo

atuar como agentes quelantes. O complexo quelante formado entre um peptídeo e um metal tem como característica ser mais estável às condições do trato gastrointestinal do que o mineral em sua forma livre. Além disso, a quelação do metal ao peptídeo impede a formação de complexos insolúveis do metal com outros componentes da alimentação que não são biodisponíveis. Portanto, a absorção desses quelatos no trato gastrintestinal é maior do que a de minerais na sua forma livre. Deste modo o quelato formado é de grande relevância no que se refere à melhoria da qualidade nutricional de alimentos, bem como na promoção da melhoria da saúde do indivíduo (13-14).

Outra atividade bastante estudada é a atividade antioxidante que os peptídeos apresentam. Compostos com ação antioxidante são importantes para a manutenção da função fisiológica, uma vez que auxiliam na manutenção do equilíbrio redox das células. Os antioxidantes são moléculas que apresentam como função o retardamento ou inibição dos danos provocados pela oxidação nas células vegetais e animais. Estes compostos atuam na captura dos radicais livres, na neutralização ou eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na ligação de íons metálicos a outros compostos, impossibilitando a produção de espécies oxidantes (15-16). Neste cenário, a busca por peptídeos com atividade antioxidante tem aumentado nos últimos anos e dentre as fontes naturais estudadas o feijão tem sido alvo de diversos pesquisadores (17).

Por fim, considerando a grande diversidade de grãos de feijão (*Phaseolus Vulgaris*), pertencentes ao grupo comercial carioca, pode-se esperar que existem diferenças no conteúdo de peptídeos, bem como nas bioatividades presentes em cada cultivar. Assim, o estudo em busca de atividades biológicas em peptídeos de diferentes cultivares é importante para nortear o uso adequado e o melhor caminho para se explorar o potencial nutracêutico desta leguminosa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O FEIJÃO

A origem do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) data de 7.000 a.C, sendo encontrado nas montanhas da América Latina e América do Sul, especificamente na região do México e nos Andes. Nestas regiões era cultivada a espécie *Phaseolus coccineus*, que com o passar dos anos sofreu dispersões para outros continentes. Com a dispersão, a variabilidade genética dos feijões foi mudando e conseqüentemente surgindo outros tipos de feijoeiro (18).

O feijão comum é classificado como sendo da ordem Fabales, família Fabaceae, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris*. Este gênero possui aproximadamente 55 espécies, mas destas, apenas cinco são cultivadas, sendo elas o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*) e o *P. polyanthus* (19).

Pequenos e grandes produtores cultivam anualmente o feijão comum, devido ser uma leguminosa de fácil plantio, que pode ser cultivada em regiões subtropicais e tropicais como o Cerrado, Mata Atlântica e o Semi-Árido. Além disso, pode ser produzido em três épocas do ano: a época das águas a qual tem sua colheita nos meses de novembro a abril e corresponde a 40 % da produção, época da seca, com a colheita em abril a julho e correspondendo 44% da produção e a época de inverno com a colheita nos meses de julho estendendo a outubro, e apresenta 16% da produção (20-21).

Há uma demanda de consumo do feijão por grande parte da população mundial devido ao seu teor nutricional. O feijão é uma boa fonte de proteínas, fibra dietética, carboidratos, vitaminas e minerais (9). Por esta razão, há vários pesquisadores que analisam e melhoram geneticamente os grãos de feijão. Neste sentido a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (Embrapa), é uma empresa especialista em melhoramento de sementes e grãos. Dentre os grãos melhorados, pesquisadores da Embrapa produziram o cultivar de feijão Pérola (linhagem LR 720982 CPL53), a partir de linhagens puras do cultivar Aporé (22).

O cultivar Pérola apresentou características favoráveis em vários estudos devido a sua alta produtividade que chega a ser 15 a 20% maior comparada aos feijões da variedade carioquinha. Este cultivar apresenta grãos maiores, de cor bege-clara, com rajas marrom-claro e brilho opaco, conforme pode ser observado na figura 1. Esta linhagem é resistente a diversas doenças, como a ferrugem e o mosaico comum e em época de plantio, o feijão Pérola foi considerado resistente à murcha de *Fusarium* e à mancha angular(22-23).

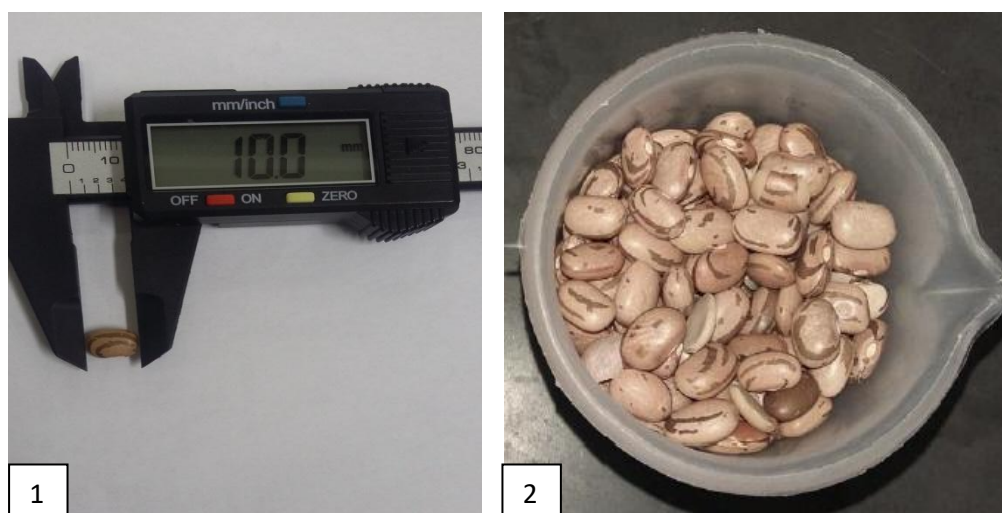


Figura 1: Imagem do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Pérola. (1) Representação da escala do feijão: 10 mm. (2) Imagem da semente de feijão. Fonte: O autor.

2.2 EFEITO *HARD-TO-COOK* (HTC)

O feijão colhido é estocado em armazéns ou galpões antes de ser transportado para o beneficiamento e posteriormente entregue aos supermercados. Durante o tempo de armazenamento, o feijão é submetido a variações nas condições ambientais, que incluem temperatura e umidade elevadas. Aproximadamente 2 meses de armazenamento, nestas condições, é suficiente para que o feijão comece a sofrer alterações na sua composição, resultando em grãos com mais resistência ao cozimento. Portanto, estes grãos perdem valor comercial, uma vez que a dureza das sementes cozidas é o fator primordial para qualidade textural do feijão e os consumidores preferem feijões que cozinham rapidamente (6, 24). Além de endurecerem, alguns feijões

sofrem alterações na cor da casca do grão, que é tomado pelo consumidor como indicativo de seu envelhecimento, e, portanto, de seu endurecimento (7). O cultivar Pérola é um destes exemplos, como pode ser observado na figura 2.

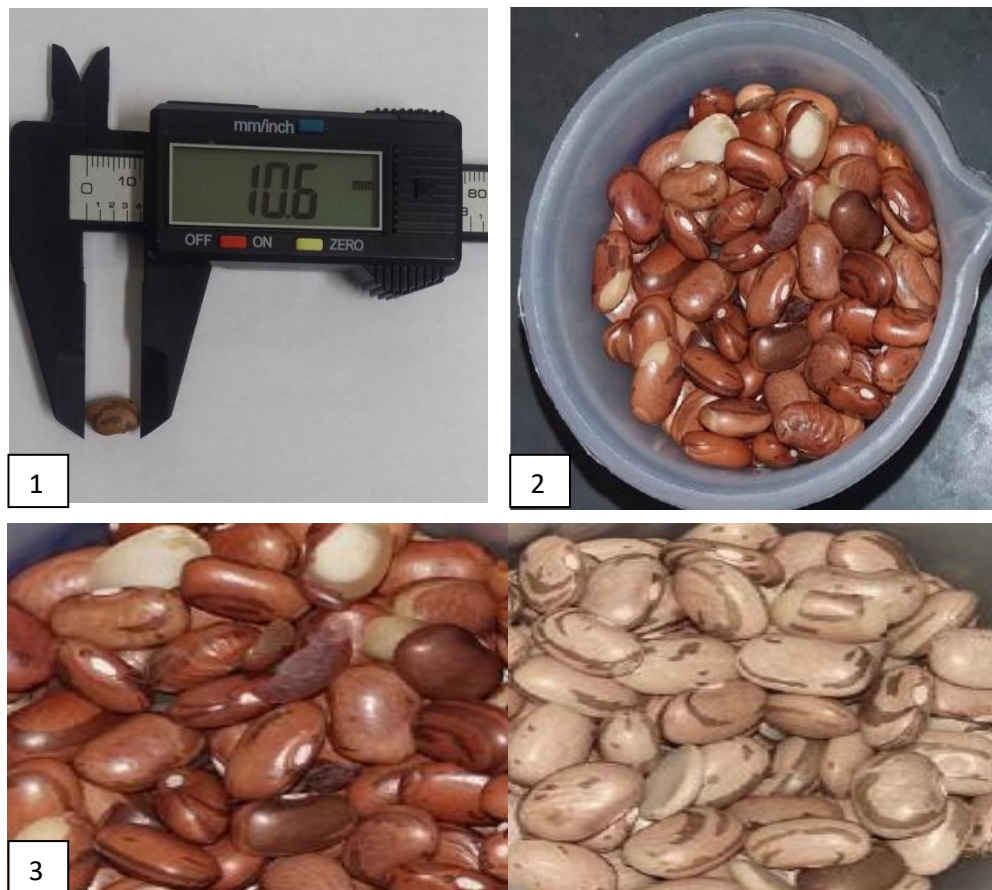


Figura 2: Imagem do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Pérola endurecido. (1) Representação da escala do feijão: 10.6 mm. (2) Imagem da semente de feijão. (3) Imagem comparativa do feijão endurecido com o recém colhido. Fonte: O autor.

Outro fator agravante na rejeição do consumidor à utilização do feijão endurecido é a redução do valor nutricional. Os grãos endurecidos continuam apresentando os nutrientes essenciais, como proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, mas a biodisponibilidade e digestibilidade destes nutrientes diminuem (8, 25)

O armazenamento inadequado dos feijões sob as condições de temperatura elevada, acima de 25°C, e a umidade relativa acima de 65% provoca a aceleração do efeito “*Hard-to-cook*” (HTC), ou seja, eles ficam

difíceis de cozinhar, em virtude do endurecimento do grão. Alguns autores propõem que esta reação resulta em alterações físicas e químicas que ocorrem a nível intercelular, tendo como consequência o aumento da estabilidade da lamela média (6, 26).

Existem várias hipóteses que tentam explicar o fenômeno HTC através de várias rotas bioquímicas, as quais envolvem diferentes tipos de reações enzimáticas. As hipóteses mais comuns referem-se à insolubilização das substâncias pécticas provenientes da ação da enzima fitase; à remoção de grupo metil das pectinas por pectinesterase; à lignificação devido à ação de polifenoloxidasas; à oxidação dos polifenóis pelas peroxidases ou polifenooxidasas; à desnaturação proteica; à hidrólise das proteínas pelas proteases; à gelatinização do amido e à oxidação de lipídeos por lipoxigenase (figura 3)(5, 26).

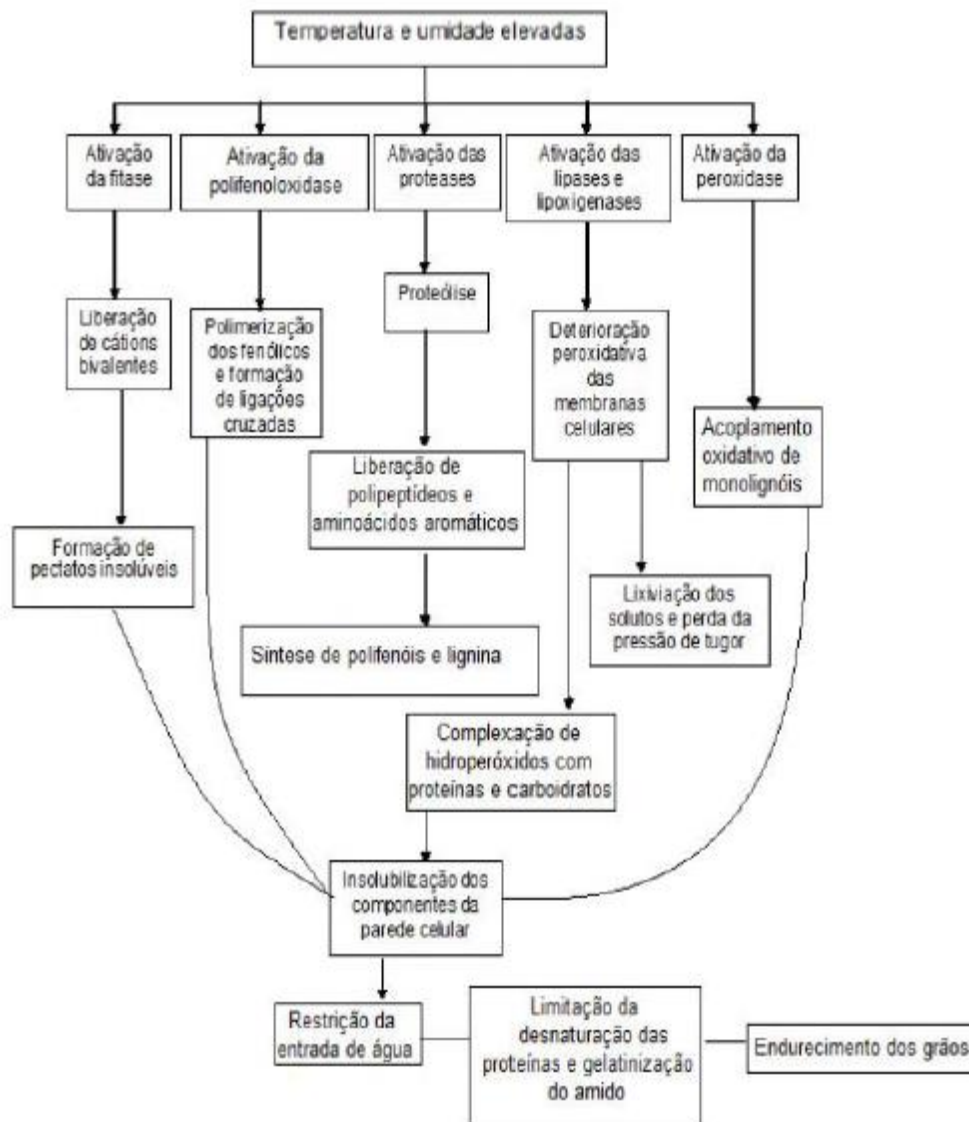


Figura 3: Possíveis explicações do processo de endurecimento através da ação de algumas enzimas. Fonte: Siqueira (2013)⁽⁷⁾.

Como o feijão endurecido não tem muita saída no comércio, é necessário evitar o processo de endurecimento, que pode ser retardado pelo armazenamento dos grãos em locais apropriados, utilizando uma atmosfera controlada. No entanto, estas condições de armazenamento levariam a uma elevação de preço do feijão que impediria o acesso de populações de baixa renda a este alimento. Outra alternativa seria desenvolver sementes menos propensas ao efeito HTC. No entanto, esta alternativa ainda esbarra no escasso conhecimento que se tem sobre as rotas bioquímicas envolvidas no fenômeno HTC (7).

2.3 PROCESSO DE AUTOCLAVAGEM

Novas aplicações tecnológicas estão sendo usadas com intuito de melhorar o valor nutricional dos grãos de feijão endurecidos. Dentre elas destacamos a tostagem, imersão em água, imersão em soluções salinas, tratamentos térmicos e extrusão (9, 27). De acordo com Montoya e colaboradores (2010)⁽²⁾ após o tratamento térmico é possível reduzir a concentração de taninos, ácido fítico, fatores antinutricionais termolábeis, como a fitohemaglutinina, inibidores de protease e oligossacarídeos. Portanto, esta simples aplicação melhora a digestibilidade e a disponibilidade de alguns nutrientes.

Dentre os tratamentos térmicos utilizados para reaproveitamento do grão de feijão endurecido, o processo de autoclavagem é uma ferramenta bastante eficiente, pois se trata de um processo térmico que envolve a associação de pressão, umidade e alta temperatura. Tais mecanismos ocasionam a redução dos fatores antinutricionais e o aumento da digestibilidade de proteínas (28)

Durante o tratamento térmico a estrutura da proteína pode sofrer algumas mudanças na sua conformação em virtude da mudança de temperatura e pressão no sistema. O aumento do calor é absorvido pela proteína e é convertido em energia cinética, que contribui para o aumento da vibração atômica. Essa movimentação interna dos átomos enfraquece as interações não covalentes de estabilização da proteína e assim as moléculas tendem a se organizarem através da mudança da sua estrutura para permanecerem estáveis dentro deste sistema. Ao incorporar a pressão ao ambiente, esta aumentará a densidade da água que envolve a proteína. Esta mudança leva à penetração das moléculas de água que estão na superfície da proteína ao seu interior. A fim de manter a estabilidade das interações não covalentes submetidas à pressão, haverá uma reorganização estrutural de suas moléculas (29).

A susceptibilidade das proteínas às mudanças de temperatura e pressão é bastante variável. Por exemplo, proteínas que contêm resíduos de cisteína são mais resistentes ao aumento de temperatura, devido às ligações dissulfeto que podem ser formadas. Por outro lado, alguns fatores antinutricionais podem desnaturar quando são submetidos ao processo de autoclavagem, pois são termolábeis (2, 29).

Alguns autores utilizaram a autoclavagem em seus testes para melhorar a qualidade nutricional do grão de feijão. Exemplo disso é o trabalho de Yu-Hui (1991)⁽³⁰⁾ que ao submeter o feijão frade a autoclavagem obteve aumento da digestibilidade do amido e da proteína. Já Vijayakumari e colaboradores (1995)⁽³¹⁾ em seus testes com *Mucuna monosperma* afirmou que a autoclavagem é um método mais eficiente para diminuir os fatores antinutricionais, e conseqüentemente aumenta a utilização de proteínas em suplementos alimentares.

Em outros estudos realizados por Guerrero-Beltrán e colaboradores (2009)⁽³²⁾ foram testados o efeito do processo térmico combinando pressão e alta temperatura em inibidores de tripsina de soja. Estes testes confirmaram que o processo de autoclavagem diminui consideravelmente a atividade de inibidores de tripsina, alcançando valores de 76% de redução da inibição da tripsina. A autora, Batista (2014)⁽²⁸⁾ também analisou o efeito da autoclavagem em inibidores de tripsina e de α -amilase em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Em seus testes foram encontrados uma redução de 50% para a atividade dos inibidores de tripsina e 42,2 % para os inibidores de α -amilase.

2.4 FATORES ANTINUTRICIONAIS

Apesar do feijão ser um alimento rico em nutrientes, a digestibilidade das proteínas e a absorção de cálcio, ferro e zinco e de outros compostos são prejudicados por alguns fatores antinutricionais, tais como inibidores de tripsina, inibidores de α -amilase, lectinas, compostos fenólicos, taninos e ácido fítico (33).

Segundo Batista (2014)⁽²⁸⁾, os inibidores de tripsina são capazes de inibir as serino-proteases pancreáticas, reduzindo a digestibilidade das proteínas ingeridas. O fósforo na forma de ácido fítico (IP1- IP2) não é digerido pelo organismo humano, e pode formar complexos insolúveis com cátions polivalentes (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}), reduzindo a biodisponibilidade destes metais.

Os taninos por sua vez, podem reagir com as proteínas formando complexos reversíveis ou irreversíveis que também interferem com a digestibilidade das cadeias proteicas. A formação do complexo proteína-tanino

se dá através de ligações entre as cadeias peptídicas da proteína e os taninos por ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos polifenóis e os grupos carbonila das proteínas. O complexo também pode ser formado pela ocorrência de interações hidrofóbicas entre o núcleo aromático do polifenol e as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos da cadeia peptídica. Os complexos resultantes não interagem adequadamente com água e acabam precipitando (34). Esta complexação impede a ação das enzimas proteolíticas, ocorrendo uma diminuição da digestibilidade proteica (35-36).

Os inibidores de tripsina presentes no feijão pertencem a duas famílias: os inibidores de Kunitz e os de Bowman-Birk. O inibidor Kunitz de *P. vulgaris* apresenta massa molecular de 21-22 kDa, contém 181 resíduos de aminoácidos e é estabilizado pela presença de duas ligações dissulfeto. A atividade de inibição do inibidor de Kunitz é ditada pela interação do inibidor com a enzima tripsina através dos resíduos de aminoácidos Arginina ou Lisina. O mecanismo de inibição da enzima tripsina se dá pela interação direta do resíduo do sítio reativo do inibidor com o sítio catalítico da enzima (9, 32).

Por outro lado, os inibidores de Bowman- Birk apresentam massa molecular de 10 kDa, contém cerca de 71 resíduos de aminoácidos e são estabilizados por sete ligações dissulfeto (45). A composição de aminoácidos e as ligações dissulfeto do inibidor de Bowman-Birk permitem a formação de uma estrutura assimétrica composta por 2 domínios independentes, um domínio que é capaz de inibir a tripsina e o outro domínio com atividade de inibição contra as enzimas quimotripsina, tripsina e elastase. Outra característica advinda da ligação dissulfeto é a rigidez da estrutura protéica, a qual torna o inibidor resistente à desnaturação em temperaturas elevadas e extremos pHs (1, 32, 37)

O feijão apresenta ainda a classe de inibidores de α -amilase, os quais são proteínas oligoméricas, compostas por subunidades glicopeptídicas, com massa molecular de 15 kDa. O inibidor de α -amilase de *P. vulgaris* é responsável pela inibição da enzima α -amilase encontrada em humanos, mamíferos e insetos (38). Ao inibir a enzima α -amilase, este inibidor provoca uma diminuição da taxa de hidrólise do amido no intestino delgado, ocasionando a baixa absorção da glicose, podendo conseqüentemente gerar alguns distúrbios metabólicos (39).

A estabilidade térmica dos inibidores de tripsina e α -amilase depende do grau de estabilização da conformação estrutural da cadeia e do peso molecular. Moléculas com maior número de ligações dissulfeto, como o inibidor do tipo Bowman-Birk, tendem a ter maior resistência às temperaturas elevadas (39-40).

Apesar da ação anti-nutricional dos inibidores de tripsina e α -amilase, estes compostos não podem ser removidos do arsenal metabólico, uma vez que são importantes para o metabolismo de defesa da planta. Além disso, estes compostos apresentam potencial nutracêutico, uma vez que são capazes de desenvolver atividade antioxidante, antisséptica e anticarcinogênica. No sistema de defesa do vegetal os inibidores de tripsina inibem a atividade proteolítica de enzimas digestivas de insetos e outros patógenos (11, 40).

2.5 PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DE FEIJÃO

O feijão comum é composto por 16-33% de proteínas, que desempenham diversas funções, como armazenamento, defesa, resposta ao estresse, desintoxicação, crescimento e desenvolvimento, transportes e metabolismo. As proteínas que constituem o feijão são classificadas como globulinas, albuminas, glutelinas e prolaminas (2, 41).

As globulinas representam 40 a 60% das proteínas totais e são consideradas proteínas de reserva, sendo a principal fração globulínica denominada faseolina. As glutelinas e prolaminas também são consideradas proteínas de reserva, sendo que a glutelina representa 20-30% das proteínas totais e a prolamina representa uma menor proporção, com 2-4% do conteúdo proteico. As albuminas representam 20% do teor de proteínas totais, e desempenham funções metabólicas importantes no feijão. São representantes desta fração protéica as enzimas; as lectinas, os inibidores de α -amilase e os inibidores de tripsina e quimiotripsina do tipo Kunitz e Bowman-birk (41-44). Algumas das estruturas das principais proteínas constituintes do feijão podem ser vistas na figura 4 (45).

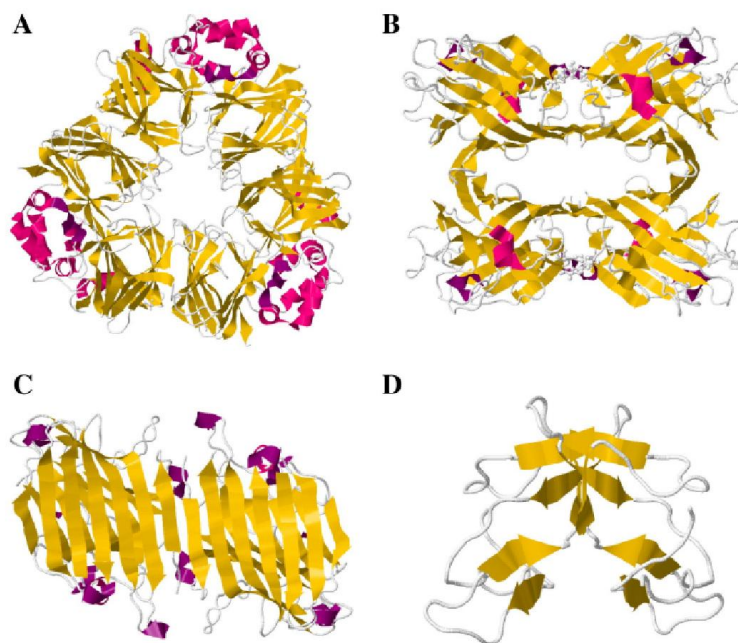


Figura 4: Representação da estrutura das principais proteínas do feijão comum. A letra A representa a estrutura da faseolina, a letra B representa a lectina, a letra C representa a arcelina e a letra D representa os inibidores de Bowman-Birk. Fonte:Luna-Vital (2015)⁽⁴⁵⁾.

As proteínas podem ser hidrolisadas, resultando em fragmentos peptídicos, por meio da ação de alcalase, pepsina, pancreatina, quimotripsina e papaína (45).

Por definição, os peptídeos são compostos resultantes da união entre dois ou mais resíduos de aminoácidos. A formação de um peptídeo ocorre pela ligação peptídica, que se dá pela ligação do grupo carboxila de um aminoácido e um grupo amina do aminoácido subsequente. Os peptídeos apresentam uma diversidade de funções; muitos deles atuam como hormônios ou fatores de liberação hormonal, atuam ainda como neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, antibióticos naturais ou ainda como adoçantes (46).

Muitos peptídeos bioativos se encontram encriptados na molécula de proteína, ou seja, estes peptídeos estão “escondidos” na cadeia polipeptídica, e nesta condição não exercem atividade biológica. Após serem hidrolisados por ação enzimática, estes peptídeos passam a desempenhar diversas atividades biológicas. Os peptídeos encriptados estão sendo bastante explorados nas

matérias primas que constituem resíduos agroindustriais, por serem agentes bioativos de fácil obtenção e de baixo custo (47).

Define-se peptídeo bioativo como sendo um fragmento protéico que exerce um impacto na função fisiológica do organismo. Esses peptídeos são diferenciados pela sua composição de aminoácidos e estrutura química e são essas características que vão influenciar no tipo de atividade biológica que o peptídeo irá desenvolver. Vários peptídeos bioativos são de ocorrência natural, ou seja, são encontrados em diversas fontes alimentares, e dentre destas fontes o feijão, dada sua rica composição protéica, é um bom exemplo a ser citado (47-48).

Atualmente utiliza-se tecnologias para purificar os peptídeos com intuito de melhorar a sua bioatividade. Destacam-se, dentre estas tecnologias a membrana de ultrafiltração e a cromatografia. A utilização de reatores de membranas de ultrafiltração iniciou durante a década de 1990 com o intuito de produzir sequências peptídicas específicas, com o passar dos anos a sua utilização foi expandida, muitos estudiosos começaram a utilizá-la para converter proteínas totais de fontes alimentícias em sequências peptídicas com propriedades nutricionais e/ ou funcionais melhoradas (48). Nestes estudos foi evidenciado que as membranas de ultrafiltração melhoram a eficiência de hidrolises enzimáticas, aumentam o rendimento do produto, produzem sequências peptídicas uniformes com massa molecular desejada e além de ser uma técnica de fácil utilização (47-48).

Outra técnica bastante utilizada é a coluna de cromatografia, que surgiu com intuito de enriquecer as frações de peptídeos hidrolisados. Recio e Visser (1999)⁽⁴⁹⁾ descrevem que ao utilizar a coluna de cromatografia as proteínas são concentradas no interior da coluna por um íon específico, deste modo os peptídeos de interesse ficam retidos no permutador de íons, enquanto que os outros peptídeos que não conseguiram se ligar aos íons de interesse são passados diretamente pela coluna. Em seguida estes peptídeos bioativos que estão retidos são eluídos e reaproveitados. Esta técnica permite que os peptídeos sejam enriquecidos e reaproveitados em grandes quantidade (48, 50).

2.6 ANTIOXIDANTES

Hábitos de vida inapropriados aumentam o aparecimento de doenças cujo fisiopatologia é determinada por estresse oxidativo. Fatores como consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercícios realizados de forma extrema e a exposição à radiação solar aceleram esse aparecimento. O estresse oxidativo ou estresse redox é um desequilíbrio entre a produção e degradação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. A eliminação do oxigênio reativo se dá pelo sistema químico e enzimático de defesa antioxidante e algumas moléculas bioativas conseguem recuperar biomoléculas quimicamente modificadas (51). Além dos fatores citados, os oxidantes também são produzidos pelo nosso organismo através de reações metabólicas durante a respiração celular (52).

Em tecidos biológicos existem inúmeros sistemas antioxidantes para manter a homeostasia e evitar danos. Nestes sistemas, estão incluídos varredores de radicais livres como o ascorbato, os quelantes de metais, as proteínas e enzimas como a superóxido dismutase e catalase que inativam o oxigênio reativo. Em circunstâncias normais, os sistemas imunológicos antioxidantes conseguem remover várias espécies reativas por ação das enzimas e com agentes antioxidantes, mas em certas ocasiões o nosso sistema de defesa não é capaz de eliminar completamente os radicais livres em excesso (52-53), criando uma situação de déficit imunológico.

Para minimizar o déficit do sistema imunológico surge a necessidade de ingerir antioxidantes sintéticos ou naturais, para impedir o estresse oxidativo e seus efeitos maléficos. Por esta razão, há um grande número de estudos de agentes antioxidantes de origem natural advindos da alimentação, e dentre estes, os peptídeos bioativos representam uma boa alternativa no combate do estresse oxidativo (52, 54).

As propriedades antioxidantes dos peptídeos derivam da sua composição de aminoácidos, estrutura e hidrofobicidade. Estudos mostraram que os peptídeos bioativos com atividade antioxidante geralmente apresentam na sua composição de 5 a 16 resíduos de aminoácidos, e a presença de Tyr, Trp, Met, Lys, Cys (52). Chen e colaboradores (1995)⁽⁵⁵⁾ demonstraram que certos aminoácidos podem apresentar maiores propriedades antioxidantes ao serem inseridos na cadeia polipeptídica. Estes autores mostraram também que

a remoção do aminoácido His da porção carboxi-terminal do peptídeo Leu-Leu-Pro-His-His resultou em redução na atividade antioxidante.

2.7 COMPLEXOS QUELANTES

Estudos recentes relataram que vários compostos metálicos ingeridos na alimentação não são absorvidos na quantidade adequada para suprir as necessidades nutricionais do corpo humano. Deste modo, o uso de medidas alternativas para a suplementação destes minerais está crescendo gradativamente. Uma dessas medidas é a aplicação de peptídeos complexados com os metais e incorporados em leite em pó, bolachas e farinha de aveia (13).

Proteínas, aminoácidos, peptídeos e polissacarídeos são moléculas que podem atuar como agentes quelantes. Estas moléculas são responsáveis pela formação de um complexo através da sua conjugação por ligações covalentes coordenada com os íons metálicos. O produto da complexação de íons metálicos com uma molécula orgânica é denominado de quelato. A palavra quelato vem do termo “chele” em grego, que significa pinça ou garra. Este conceito é adequado porque na complexação há um compartilhamento dos elétrons de um metal e um ligante (56-57).

Para que haja a quelação, os componentes envolvidos no complexo devem apresentar algumas propriedades específicas. Sendo assim, eles precisam possuir grupos funcionais capazes de estabelecer as ligações covalentes e coordenativas (figura 5). Além disso, para que o quelato consiga ter uma boa absorção e assim suprir as necessidades nutricionais, ele deve apresentar baixa massa molecular, ter constante de estabilidade adequada a ponto de ser nutricionalmente funcional e o ligante deve ser metabolizado pelo organismo (58).

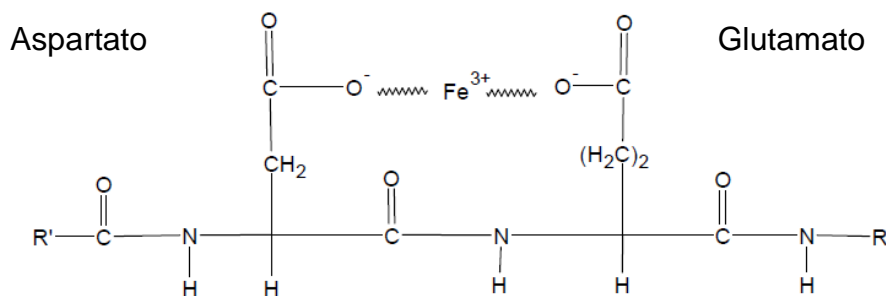


Figura 5: Complexo quelante Ferro-peptideo. Fonte: Autor.

2.8 IMPORTÂNCIA DO FERRO E DO COBRE

A manutenção da saúde e do bom desempenho das funções metabólicas está intimamente relacionada à ingestão de minerais. Entretanto, a rotina acelerada do mundo atual vem influenciando na alimentação das pessoas, levando-as a ingerir cada vez menos vitaminas e minerais, o que acaba resultando em danos à saúde. Por esta razão, têm-se estimulado a ingestão de frutas, verduras, legumes e leguminosas, que são fontes de minerais. Além disso, a suplementação de compostos inorgânicos é necessária uma vez que nosso organismo não é capaz de sintetizá-los (59).

Dentre os diversos minerais existentes, o cobre é um oligoelemento que deve ser ingerido em pequenas quantidades. O cobre desempenha importantes funções como cofator de enzimas envolvidas na produção de energia celular (Citocromo-C-oxidase), na desintoxicação de radicais livres (cobre-zinco superóxido dismutase ou SOD), na produção do tecido conjuntivo (lisil oxidase), na mobilização de ferro (ceruplasmina) e na neurotransmissão (dopamina-β-hidroxilase) (60). Entretanto o excesso de cobre no organismo pode resultar na produção de produtos oxidativos que estão envolvidos em muitos processos de indução do estresse oxidativo e em processos envolvidos na carcinogênese (61).

Outro importante mineral é o ferro, considerado um metal de transição mais abundante na terra, sendo encontrado em vários seres vivos. Este elemento traço é indispensável ao organismo, uma vez que ele atua como um cofator de diversas proteínas e enzimas, participa de muitos processos

celulares, tais como a respiração, reações de transferência de elétrons, metabolismo energético, síntese de DNA e regulação gênica (62-63).

Entretanto o excesso de ferro no organismo pode causar danos à saúde, por ser considerado um elemento reativo, o ferro pode gerar intoxicações quando em excesso, uma vez que ele tem capacidade de formar espécies reativas de oxigênio (ERO). As espécies reativas de oxigênio que foram formadas a partir do ferro reativo podem ocasionar o envelhecimento celular e processos degenerativos. Além disso, o acúmulo excessivo de ferro no fígado também pode levar ao surgimento de carcinoma hepatocelular (64).

2.9 METABOLISMO DE FERRO

O ferro pode ser encontrado sob duas formas, o Fe^{2+} (ferroso) ou Fe^{3+} (férico), sendo que o íon ferroso é solúvel em meio fisiológico, mas quando se tem a presença de oxigênio molecular ele pode ser oxidado para o estado férico, tornando-se insolúvel. Por esta razão, apesar de ingerirmos aproximadamente 12-18 mg de ferro sob a forma de íon férico por dia, apenas 1-2 mg são absorvidos. Deste modo, é necessário que o ferro sob forma de íon férico seja reduzido para a forma ferrosa, garantindo assim a sua absorção nos enterócitos duodenais (65-66).

O ferro sob a forma férica é considerado no organismo como ferro não heme. Este íon é encontrado nos alimentos de origem vegetal como hidróxido de ferro, sais de ferro ou proteínas férricas. Já em alimentos de origem animal encontra-se o ferro sob a forma heme, o qual foi liberado da estrutura proteica da hemoglobina, mioglobina, ou outras hemoproteínas. Este ferro-heme não precisa ser reduzido e é facilmente absorvido pelo enterócito. Deste modo, o ferro pode ser absorvido em 2 estágios: a absorção do ferro heme que proverá ferro para hemoglobina, mioglobina, hemoproteínas e enzimas, e a absorção do ferro não heme, destinado a suprir todos os outros compostos de ferro (64, 67).

A forma de absorção do ferro heme ainda não foi muito bem definida. Autores como Crichton e colaboradores (2002)⁽⁶⁶⁾ relatam que o ferro heme se liga à membrana dos enterócitos, e em seguida é transportado através da membrana. No interior do citoplasma o ferro heme é transportado sob a forma

de uma vesícula membranosa, até ser degradado pela heme oxigenase produzindo o íon ferroso, como pode ser visto na figura 4. No citoplasma do enterócito o ferro pode ter dois destinos definidos pela demanda corporal de ferro. Quando a taxa de ferro no organismo está baixa, o ferro é incorporado à ferritina, ficando armazenado no eritrócito. Por outro lado, quando a taxa de ferro está alta, o íon ferroso é oxidado pela hefaestina (ferroxidase) em íon férrico e em seguida incorporado à ferroportina. Essa proteína transporta o Fe^{3+} pela membrana basolateral, permitindo a sua ligação com a transferrina, que irá transportar o ferro pelo plasma até chegar aos tecidos (64).

Para que o ferro não heme seja absorvido é necessário primeiramente que o ferro inorgânico seja reduzido ao íon ferroso, pela ação do ácido clorídrico do estômago ou por enzimas ferriredutases DcytB encontradas na superfície da membrana do enterócito (67-68). Outros agentes também podem auxiliar esta absorção, tais como aminoácidos que se ligam ao ferro formando quelatos de baixo peso molecular (69). Ao atingir a membrana do enterócito, o transporte do ferro é mediado pelo transportador de metal divalente (DMT1). Ao chegar no interior da célula, caso o teor de ferro no sangue esteja baixo, este pode ser transportado pela transferrina e levado para a corrente sanguínea; no caso o teor de ferro no sangue esteja alto, ele é armazenado nos tecidos por intermédio da ferritina (62, 68). O esquema de absorção do ferro não heme pode ser observado na figura 6.

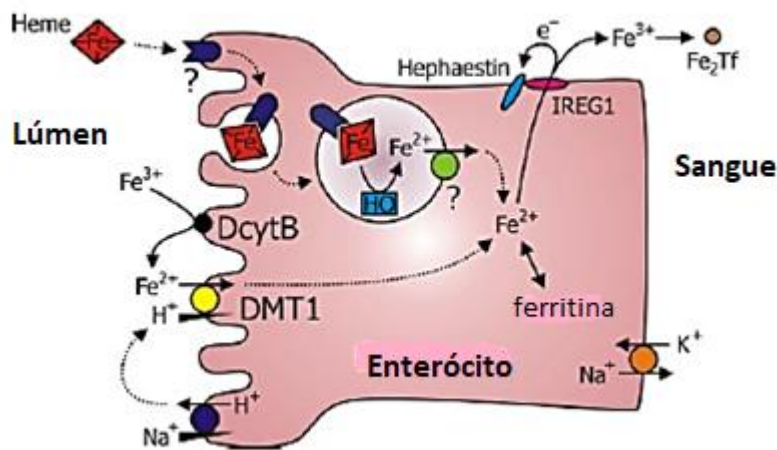


Figura 6: Mecanismo de absorção do ferro não heme e heme no enterócito.
 Fonte: Mackenzie e Garrick (2015)⁽⁶⁸⁾ com modificações.

Os níveis de ferro presente no organismo também são regulados por intermédio de mecanismos moleculares no organismo com intuito de manter a homeostasia, que varia de acordo com a demanda de ferro disponível na corrente sanguínea. A regulação dos níveis de ferro se dá através da hepcidina que é um hormônio derivado de peptídeos. Quando os níveis de ferro são elevados, os hepatócitos sintetizam e excretam hepcidina na circulação, que interage com a ferroportina, uma proteína presente na membrana basolateral das células que exporta o ferro. Ao se ligar com a ferroportina, a hepcidina inibe a exportação de ferro à corrente sanguínea, resultando nos baixos níveis de ferro e o equilíbrio é retornado. Esta regulação molecular se dá através do sistema de retroalimentação negativa (70).

3. JUSTIFICATIVA

O feijão é mundialmente consumido, principalmente nos países da América, África e da Ásia. A aceitabilidade do feijão na alimentação humana é em virtude das suas propriedades nutricionais, uma vez que, ele é uma boa fonte de proteínas, aminoácidos essenciais, tais como a lisina; carboidratos, vitaminas, tais como as vitaminas do complexo B, minerais (potássio, ferro, cálcio, zinco e magnésio), fibras e dentre outros (71-74). Outro aspecto bastante importante é que o feijão é considerado um alimento protéico de baixo custo, comparado com os alimentos derivados de carnes, sendo assim, o feijão é uma fonte de proteína acessível à população de baixa renda (72).

Entretanto, devido às mudanças climáticas do Brasil, o feijão sofre anualmente oscilações no preço, este impasse acaba restringindo o consumo para a população de baixa renda. Para equilibrar a oferta de preço anual, são necessários 3 safras ao ano, sendo elas 1º safra ou safra das águas, 2º safra ou safra da seca e a 3º safra ou safra de inverno, sendo que esta última safra apresenta uma alta produtividade alcançando em determinadas regiões acima de 3.500 kg/há (73).

Alem de diminuir a oscilação de preço do mercado as safras são importantes para diminuir o tempo de armazenamento dos feijões em galpões, uma vez que os feijões sofrem o processo de endurecimento quando são armazenados de forma inadequada e por longos períodos de tempo (28). Conforme o feijão vai endurecendo, ele vai apresentando algumas características que contribuem para sua rejeição no mercado, como por exemplo, o tempo de cocção do grau aumenta, há alteração de textura e sabor, e redução do valor nutricional (7-8). Essas alterações físico-químicas são conhecidas como fenômeno “hard-to-cook” (HTC), este fenômeno ocorre quando os grãos de feijões são armazenados em alta umidade (> 65 %) e temperaturas elevadas (> 25°C)(5, 75).

É possível utilizar o feijão HTC mediante o emprego de algumas aplicações tecnológicas tais como a extrusão, imersão em água, tratamento salino, tostagem e tratamento térmico, como a autoclavagem (9). Estas aplicações melhoram o valor nutricional do feijão através da redução de

taninos, ácido fítico, fatores antinutricionais termoláveis, como inibidores de proteases e oligossacarídeos (10).

Nos últimos anos, a busca por alimentos nutracêuticos está cada vez mais alta, uma vez que estes alimentos apresentam em sua composição compostos bioativos que exercem importantes funções fisiológicas no organismo (54, 76). Dentre estes alimentos se destaca o feijão; ele apresenta em sua composição peptídeos que pode desencadear diversas atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, atividade quelante, atividade anticancerígena, atividade anti-hipertensiva e entre outras (11, 17, 45, 77).

Visando essas características este projeto foi desenvolvido com intuito de testar as atividades antioxidantes e quelantes dos peptídeos derivados do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Pérola. Sabendo-se que é possível utilizar o feijão endurecido mediante ao emprego de tecnologias, como por exemplo, a autoclavagem, este estudo buscou testar a bioatividade nestes grãos. Deste modo utilizou os feijões em diferentes tratamentos: recém-colhido, endurecido (HTC) e autoclavado (AUT).

4. OBJETIVOS

4.1 OBEJTIVOS GERAIS

O presente estudo tem por objetivo estudar a atividade antioxidante, quelante de ferro e de cobre de frações proteicas extraídas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), cultivar Pérola.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as proteínas do feijão comum presente nos extratos obtidos por diferentes métodos de extração;
- Analisar o perfil eletroforético das proteínas presentes nos extratos obtidos;
- Fracionar por filtração em membrana os peptídeos de massa molecular inferior a 10 kDa;
- Analisar a presença de inibidores de protease e de α -amilase nos extratos;
- Estabelecer a atividade quelante de ferro e cobre dos extratos totais e nas frações menores que 10 kDa;
- Avaliar a estabilidade térmica da atividade quelante e inibitória presente na fração menor que 10 kDa;
- Demonstrar a capacidade quelante da fração menor que 10 kDa;
- Verificar a estabilidade gástrica do complexo peptídeo-ferro e peptídeo-cobre;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos e da fração menor que 10 kDa;
- Calcular a quantidade de ingesta de ferro ingerido por cada organismo vivo;
- Examinar a absorção do complexo peptídeo-ferro.
- Estimar os níveis de excreção do ferro *in vivo*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PREPARO DA AMOSTRA

5.1.1 MATERIAL

O material utilizado no presente estudo foi fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás. Os feijões fornecidos pertencem à espécie *Phaseolus vulgaris*, cultivar Pérola, do grupo comercial carioca. Os grãos controle, sem endurecimento, foram armazenados sob refrigeração a 5 °C. Estes grãos foram denominados como “easy- to-cook” (ETC).

Para o endurecimento dos feijões foi utilizada a metodologia descrita por Ribeiro e colaboradores (2009)⁽⁷⁸⁾. Para tanto os grãos foram armazenados em estufa, por 120 dias à temperatura de 40 °C e 75% de umidade relativa.

Os feijões foram colocados em um pote de vidro com a tampa semi-enroscada. O processo de autoclavagem se deu por 15 min à temperatura 120 °C e pressão 121 kgf/ cm².

5.1.2 OBTENÇÃO DA FARINHA DO FEIJÃO COMUM

Os materiais utilizados neste estudo foram provenientes de farinha de feijão recém-colhido (ETC), do feijão endurecido (HTC), e do feijão endurecido autoclavado (AUT). As farinhas foram produzidas com feijões descascados manualmente, passados em moinho de facas e posteriormente tamizados (500 µm). As farinhas foram armazenadas em sacos plásticos com vedação e acondicionadas em uma geladeira, a -4°C.

5.2 EXTRAÇÕES DAS FRAÇÕES PROTEICAS

Para fazer a extração das frações proteicas utilizou-se a metodologia descrita por Mahatmato et al (2014)⁽⁷⁹⁾ para os métodos de extração 1, 2 e 3 e para o método 4 utilizou-se a metodologia descrita por Oseguera-Toledo et al (2011)⁽⁷¹⁾, como descrito a seguir:

5.2.1 MÉTODO 1: EXTRAÇÃO POR ACETONITRILA/ÁGUA/ÁCIDO FÓRMICO

Nesta extração, a cada 1 g de farinha foram adicionados 5 mL de uma solução contendo acetonitrila, água e o ácido fórmico na proporção 25: 24: 1. A amostra foi submetida à agitação, por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante recolhido foi concentrado até o volume de 1,5 mL em concentrador Concentrator Vacufuge® plus (Eppendorf). O material obtido, denominado extrato 1 (E1), foi liofilizado e armazenado a temperatura ambiente.

5.2.2 MÉTODO 2: EXTRAÇÃO POR ACETATO DE SÓDIO

Neste método usou-se a proporção de 1 g de farinha para 5 mL de solução de acetato de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 5,0. Em seguida, a amostra foi incubada por 1 hora sob agitação orbital constante, 4 °C. Após a incubação, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante recolhido. Ao sobrenadante foram adicionados 5 mL de acetona e foram incubados por 5 minutos sob agitação orbital constante, a 4 °C. A amostra foi centrifugada por 5 min, as proteínas precipitadas foram descartadas e o sobrenadante contendo peptídeos foi recolhido e concentrado até o volume de 1,5 mL em aparelho Concentrator Vacufuge® plus (Eppendorf). Após esta etapa, o extrato, denominado extrato 2 (E2), foi liofilizado e armazenado a temperatura ambiente.

5.2.3 MÉTODO 3: EXTRAÇÃO POR BICARBONATO DE AMÔNIO

No terceiro método de extração utilizou-se a proporção de 1 g de farinha para 5 mL de solução de bicarbonato de amônio 5 mmol L⁻¹, pH 8,0. A amostra foi submetida a agitação, à temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi incubado a 100 °C por 5 minutos. Novamente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos, o sobrenadante foi liofilizado e armazenado a temperatura ambiente. Este material foi denominado extrato 3 (E3).

5.2.4 MÉTODO 4: EXTRAÇÃO POR SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA

No último método de extração usou-se a proporção de 1 g de farinha para 5 mL de água destilada. O pH foi ajustado para pH 8,0 com uso de NaOH 100 mmol L⁻¹ e a amostra foi submetida a agitação orbital, por 1 hora a 35 °C. O material foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e armazenado. O precipitado foi submetido a um processo de re-extração nas mesmas condições citadas acima. Após a re-extração, sobrenadante resultante foi reunido ao primeiro sobrenadante. Estes foram liofilizados e armazenados a temperatura ambiente. Este material foi denominado extrato 4 (E4).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para dosar a quantidade de proteínas nos extratos foi utilizando o kit Qubit® Protein Assay e o equipamento Qubit® Fluorometer (Invitrogen). Neste método é utilizado um fluóforo e um fluorímetro que quantifica a intensidade de fluorescência presente em cada amostra, que é diretamente proporcional à concentração de proteína da amostra.

5.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Neste estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970)⁽⁸⁰⁾ para preparação de gel de acrilamida e duodecilsulfato de sódio (SDS). Para o gel de corrida foi utilizada a acrilamida na concentração de 12% (p/v) e no gel de concentração da amostra foi utilizada na concentração de 5% (p/v). As amostras foram preparadas misturando 20 µL de extrato contendo 25 µg de proteína com 10 µL de tampão de amostra contendo sacarose e ureia. Posteriormente a amostra foi agitada e submetida ao tratamento térmico por 5 minutos a temperatura de 100 °C. Desta solução foram retirados 20 µL e colocados no gel de poliacrilamida. A corrida foi realizada durante 3 horas sob uma tensão de 200 A. O marcador de peso molecular do padrão de proteína utilizado foi o Armersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (Termofisher). As proteínas presentes nos géis foram coradas com o reagente

de cor “coomassie blue R250”, durante 30 minutos, e descoradas com uma solução de metanol (40% v/v) e de ácido acético (10% v/v) durante três horas.

5.5 TESTE DE INIBIDORES DE ENZIMAS

5.5.1 ATIVIDADE DE INIBIDOR DE TRIPSINA

Para testar a atividade de inibidor de tripsina foi utilizada a metodologia descrita por Arnon (1970)⁽⁸¹⁾ com modificações. A 450 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 mmol L⁻¹ pH 7,6 foram adicionados 50 µL de solução de tripsina 0,5 mg mL⁻¹ preparada no mesmo tampão. A mistura foi incubada por 10 min, a 37 °C, em seguida se deu a adição de 500 µL de solução de substrato contendo caseína 1% (p/v). Após a adição da caseína a solução foi incubada por mais 10 min a 37 °C. A reação foi parada com a adição de 750 µL de ácido tricloroacético 10 % (p/v), o ensaio foi deixado em repouso por 30 min a temperatura ambiente e em seguida foi centrifugado por 10 min a 1000 rpm e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 280 nm.

O ensaio de inibidor foi feito nas mesmas condições, substituindo-se 250 µL de tampão por igual volume de E2 contendo 50 µg de proteína. Ensaio em branco foram feitos para a amostra e para o substrato. No branco da amostra a adição de TCA se deu imediatamente após a adição da caseína e no branco do substrato, não houve adição de amostra e de tripsina, sendo estes volumes substituídos por tampão.

Uma unidade de enzima (UE) foi definida como a quantidade de enzima que produz 0,1 de absorbância a 280 nm. Uma unidade de inibidor (UI) foi definida como sendo a quantidade de inibidor que reduz a atividade da enzima em 0,1 na absorbância, como demonstrado na equação:

$$UI = UE_{enzima\ sem\ extrato} - UE_{enzima\ +\ extrato}$$

5.5.2 ATIVIDADE DE INIBIDOR DE α-AMILASE

Para o ensaio de atividade de inibidor de α-amilase foi utilizada metodologia descrita por Deshpande et al (1982)⁽⁸²⁾. O ensaio foi realizado pela

a adição de 80 μL de tampão acetato de sódio 0,1 mmol L^{-1} , pH 5,0 a 20 μL de solução de α -amilase de *Aspergillus niger*. Em seguida foram adicionados em cada tubo 100 μL de solução de amido 0,5% (p/v) preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e a reação incubada por 15 min, a 40° C. Após a reação, foram retirados 100 μL das soluções e a estes foram adicionados 900 μL de reativo de ADNS (ácido-3,5-dinitro-salicílico). A mistura foi incubada por 5 min em banho fervente. Após resfriar a temperatura ambiente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 550 nm.

Para fins de comparação a atividade de inibidor de α -amilase foi medida nas mesmas condições, substituindo-se 20 μL do tampão por E2 contendo 50 μg de proteína. Ensaios em branco foram feitos para a amostra e para o substrato. Neste ensaio, o volume do extrato foi substituído por tampão. No branco da amostra a reação se deu na ausência de enzima e no branco do substrato a reação se deu na ausência da enzima e do extrato sendo estes volumes substituídos por tampão.

Uma unidade de α -amilase (UE) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de açúcar redutor $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$. A unidade de inibição é determinada de acordo com a equação:

$$UI = UE_{\text{enzima sem extrato}} - UE_{\text{enzima + extrato}}$$

5.6 FRACIONAMENTO PROTEICO

O E1 foi submetido ao processo de ultrafiltração em uma membrana de 10 kDa (Amicon Bioseparations). Para realizar o processo de ultrafiltração foi utilizado gás nitrogênio, gerando uma pressão de 50 kgf/cm^2 ao sistema. Foram colocados 10 mL de extrato e ao fim da ultrafiltração foram obtidos 9 mL de fração menor que 10 kDa ($F < 10$). A fração maior que 10 kDa ($F > 10$), retida na membrana, foi removida com lavagens utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0.

5.7 TRATAMENTO TÉRMICO DAS FRAÇÕES PROTEICAS

O E1 e as frações $F > 10$ e $F < 10$ foram submetidos ao um processamento térmico. As amostras foram incubadas em banho-maria na temperatura de 80

°C, por 15 min. Após o processo, as amostras foram deixadas em repouso até que atingissem a temperatura ambiente e em seguida armazenadas para as próximas etapas do experimento.

5.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM DPPH

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com metodologia descrita por Nazeer et al. (2012)⁽⁸³⁾ utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) como agente antioxidante. Para fazer o ensaio foram utilizados 200 µL de DPPH (0,15 mmol L⁻¹), 50 µL de amostra (concentrações de: 50 µg de proteína para os extratos, 10 µg de proteína para a fração > 10 kDa e 5 µg de proteína para a fração < 10 kDa). O ensaio permaneceu em repouso por 15 minutos e logo após foi feita a leitura em um espectrofotômetro de microplacas (EPOCH) ao comprimento de onda de 520 nm. A determinação da atividade antioxidante foi expressa através da curva de calibração usando Trolox (R² =0.9917).

5.9 ATIVIDADES QUELANTES

5.9.1 ATIVIDADE QUELANTE DE COBRE

Para a realização do ensaio da atividade quelante de cobre foi utilizada a metodologia descrita por Carrasco-Castilla et al. (2012)⁽¹⁷⁾ com adaptações. Neste ensaio foram utilizados 200 µL de tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo 10 µg de cobre e 50 µL da amostra (concentrações de: 50 µg de proteína para os extratos, 10 µg de proteína para a fração > 10 kDa e 5 µg de proteína para a fração < 10 kDa). O ensaio foi deixado em repouso por 10 min. Posteriormente foram colocados 5 µL de pirocatecol violeta 4 mM e a leitura foi feita em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH) no comprimento de onda de 632 nm. EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foi utilizado como controle positivo e o controle negativo do ensaio foi feito na ausência de amostra. A figura 7 mostra as colorações obtidas nos controles positivo e negativo do teste. Para determinação da porcentagem de atividade quelante foi utilizada a equação a seguir:

$$\text{Atividade quelante\%} = (\text{Abs}_{\text{controle p}} - \text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle p}}) \times 100$$

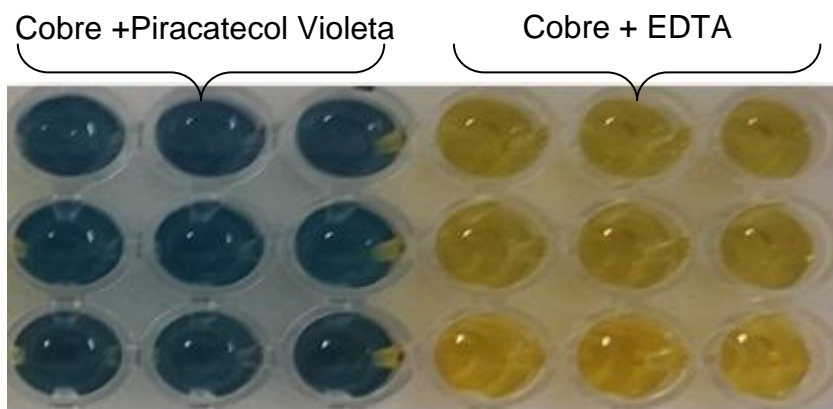


Figura 7: Microplacas evidenciando a atividade quelante de cobre. O complexo cobre-pírocatecol violeta apresenta cor azul e a presença de EDTA (controle positivo) é indicada pela cor amarela. Fonte: O autor.

5.9.2 ATIVIDADE QUELANTE DE FERRO

Para testar a atividade quelante de ferro foi utilizado a metodologia descrita por Carrasco-Castilla et al. (2012)⁽¹⁷⁾ com adaptações. Neste teste, foram utilizados 180 μL de tampão acetato de sódio 100 mmol L^{-1} , pH 4,9; 60 μL de solução de cloreto de ferro tetra hidratado (contendo 1,12 mg de Fe^{2+}) e 50 μL da amostra (concentrações de: 50 μg de proteína para os extratos, 10 μg de proteína para a fração > 10 kDa e 5 μg de proteína para a fração < 10 kDa). O ensaio foi deixado em repouso por 30 minutos e em seguida foram acrescentados 10 μL de ferrozina, 40 mM. Após 5 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH) no comprimento de onda de 560 nm. O controle positivo do teste foi feito na presença de EDTA e o controle negativo foi feito na ausência de amostra. A figura 8 evidencia as colorações obtidas nos controles positivo e negativo do teste. Para determinação da porcentagem de atividade quelante foi utilizada a equação a seguir:

$$\text{Atividade quelante \%} = (\text{Abs}_{\text{controle p}} - \text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle p}}) \times 100$$

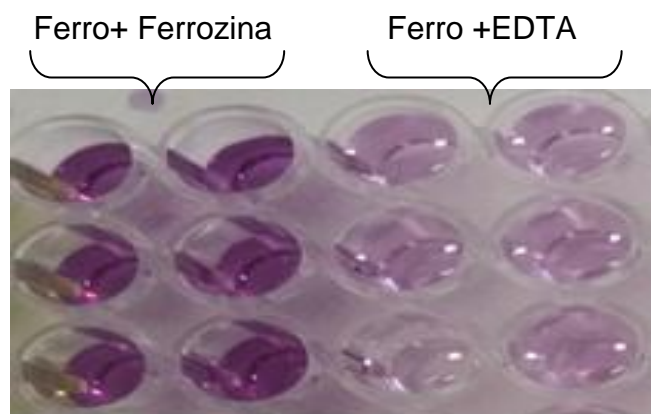


Figura 8: Microplacas evidenciando a atividade quelante de ferro. O complexo ferro-ferrozina apresenta cor violeta e a presença de EDTA é indicada pela redução na cor do ensaio. Fonte: O autor.

5.10 CAPACIDADE DE QUELANTE DE COBRE E FERRO

A fim de se determinar a capacidade quelante de cobre da fração proteica foram feitos ensaios como descrito no item 5.9.1, com concentrações de proteína variando de 10 a 60 μg . Para determinar a capacidade quelante de ferro foram feitos ensaios conforme descrito no item 5.9.2, variando-se a concentração de proteína entre 10 e 60 μg . A capacidade quelante foi estabelecida como a concentração de proteína suficiente para quelar todo o cobre ou todo o ferro disponível no meio de reação.

5.11 PREPARO DO COMPLEXO PEPTÍDEO-METÁLICO

5.11.1 COMPLEXO COBRE- PEPTÍDEO

Para preparar o complexo cobre-peptídeo foram utilizados 8 mL de solução tampão contendo fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 6,0, 10 μg de cobre e 2 mL de F<10 kDa (60 μg de proteína). A reação foi realizada à temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação. A cada 15 min foi verificado o pH do meio, a fim de mantê-lo constante em pH 6,0. Posteriormente a mistura foi centrifugada por 20 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado à temperatura ambiente.

5.11.2 COMPLEXO FERRO-PEPTÍDEO

Para o preparo do complexo peptídeo-ferro foram adicionados 2 mL de solução de cloreto de ferro tetra hidratado contendo 1,12 mg de Fe^{2+} a 1,6 mL de F<10 kDa contendo 60 μg de proteína e 6,4 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mmol L^{-1} , pH 4,9. O ensaio foi realizado sob agitação, incubando-se o sistema por 1 hora à temperatura ambiente. A cada 15 min foi verificado o pH, a fim de mantê-lo constante em pH 4,9. Posteriormente a mistura foi centrifugada por 20 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado à temperatura ambiente.

5.12 ESTABILIDADE DO COMPLEXO PEPTÍDEO-METÁLICO ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS

Para realizar o teste de estabilidade gástrica do complexo peptídeo-metálico foi utilizada a metodologia descrita por Silva (2013)⁽⁸⁴⁾ com adaptações. Para realizar a digestão gástrica *in vitro* foi utilizado 2 mg de complexo peptídeo-metálico (para o complexo peptídeo-cobre continha concentração de 60 μg de proteína e 10 μg de Cobre, para o complexo peptídeo-ferro continha concentração de 60 μg de proteína e 1,12 mg de Fe^{2+}) e 1,9 mL de fluido gástrico (NaCl 35 mmol L^{-1} , pH 2,0). A mistura foi incubada por 15 min, a 37 °C e em seguida foram adicionados ao ensaio 100 μL de solução de pepsina (1,0 mg mL^{-1}) e este foi incubado sob agitação orbital por 1 hora, a 37 °C. Logo após, o ensaio foi ajustado a pH 4,9 com NaOH 1M para o ensaio do complexo peptídeo-ferro. Para o ensaio do complexo peptídeo-cobre foi ajustado para pH 6,0 com NaOH 1 M. Ambas as amostras foram centrifugado por 20 min a 5000 rpm.

O teor de ferro livre no sobrenadante foi determinado pelo método colorimétrico da ferrozina descrito por Carrasco-Castilla et al. (2012)⁽¹⁷⁾. Neste ensaio foram utilizados 290 μL do sobrenadante e 10 μL de ferrozina, 40 mM. Após 5 minutos de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH) no comprimento de onda a 560 nm.

O teor de cobre livre no sobrenadante foi determinado pelo método colorimétrico do Piracatecol violeta descrito por Carrasco-Castilla et al (2012)⁽¹⁷⁾. O ensaio utilizou-se 250 μL do sobrenadante e 5 μL de Piracatecol

Violeta 4 mM. Em seguida o ensaio foi lido em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH) no comprimento de onda a 632 nm.

5.13 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

5.13.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar machos, com peso aproximado de 200-250 g. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Goiás (Go-Brasil). O projeto foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPI-UFG, Protocolo nº 040/16.

A metodologia foi baseada nos experimentos descrito por Souza e colaboradores (2007)⁽¹⁴⁾ com pequenas modificações. Os animais foram separados em 5 grupos, com 4 animais em cada grupo, recebendo tratamentos diferentes. As concentrações de ferro oferecidos aos animais foram baseados no Nutrient Requirements of laboratory Animals (1995)⁽⁸⁵⁾.

Grupo 1: animais recebendo dieta comercial AIN 93-M (ração normal).

Grupo 2: animais recebendo dieta a base de caseína, sem nenhuma fonte de ferro

Grupo 3: animais recebendo dieta a base de caseína e quelato de ferro comercial (0,07 g de ferro por kg de caseína)

Grupo 4: animais recebendo dieta a base de caseína e ferro inorgânico ($\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) (0,04 g de ferro por kg de caseína)

Grupo 5: animais recebendo dieta a base de caseína e complexo peptídeo-ferro (0,07 g de ferro por kg de caseína)

Os animais foram alojados primeiramente em caixas individuais (47cm x 31cm x 16cm), permanecendo 24 horas em jejum e com água *ad libitum*, com exceção do grupo 1 que tiveram comida e água *ad libitum*. Posteriormente os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais de acrílico por 3 dias, recebendo comida e água *ad libitum* (figura 9). O ferro foi incorporado na alimentação dos animais no último dia de experimento. Os ratos alojados nas gaiolas ficaram armazenados em uma sala específica, com temperatura controlada entre $22 \pm 24^\circ\text{C}$ e com ciclos de claro e escuro 12/12 h; do

Laboratório de Fisiologia Terapêutica e Cardiovascular da Universidade Federal de Goiás (UFG).

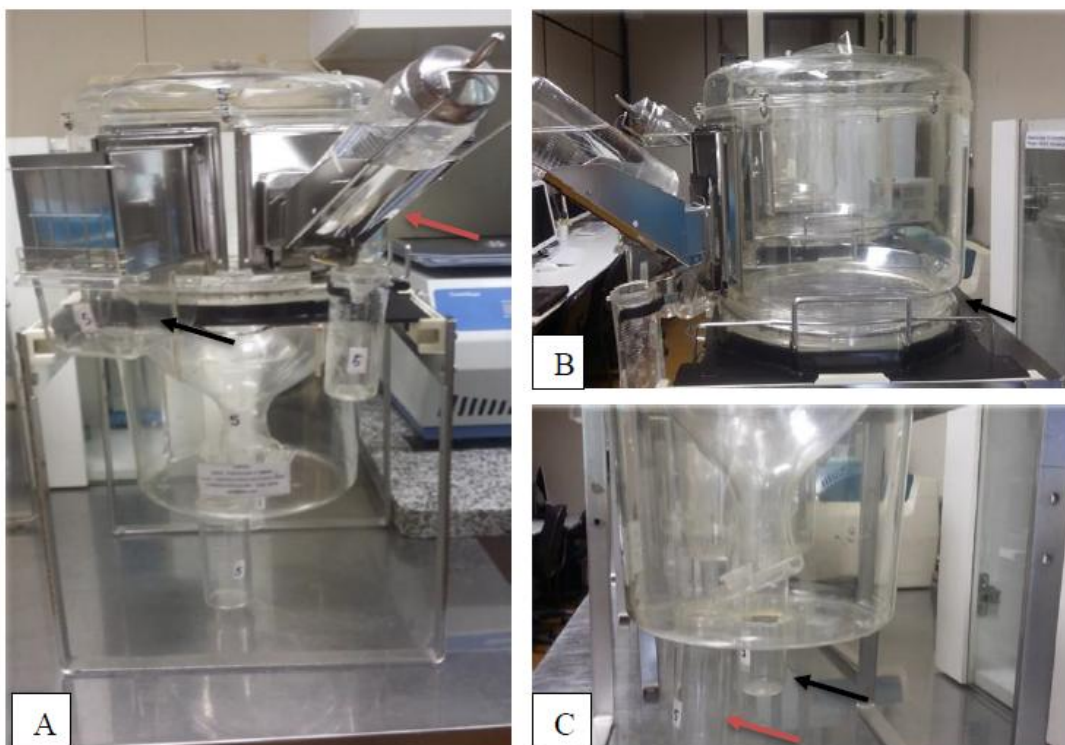


Figura 9: Gaiola metabólica para ratos. A figura **A** mostra a gaiola metabólica, a seta laranja evidencia o local onde é armazenado a comida do animal e a seta vermelha evidencia onde é colocado o bebedor de água. Figura **B** mostra onde o rato é acondicionado dentro da gaiola. A figura **C** mostra onde são colocados os tubos coletores de excretas, a seta laranja evidencia o tubo coletor de fezes e a seta vermelha evidencia o tubo coletor de urina. Fonte: Autor.

Diariamente foi medida a quantidade de água e ração ingerida, com intuito de estimar o consumo de dieta, quantidade de ferro e de água ingerida. A figura a seguir apresenta a ordem cronológica dos experimentos.

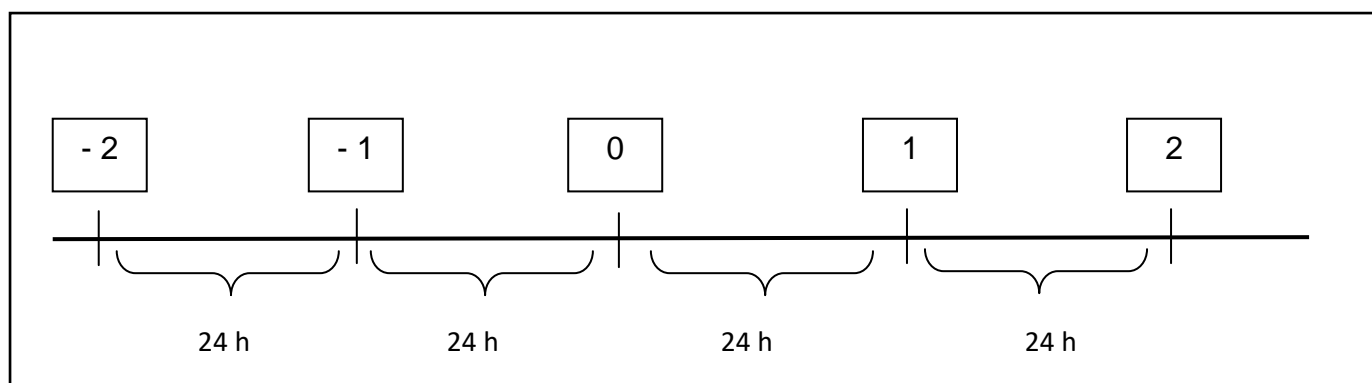


Figura 10. Representação esquemática da sequência experimental. No dia -2, os animais foram pesados e em seguida colocados em caixas individuais, onde permaneceram em jejum por 24 horas, com exceção do grupo de ração. No dia -1, os animais foram colocados nas gaiolas metabólicas, se alimentando de comida e água *ad libitum*. No dia 0, foi pesado a ração e medido o volume de água para fazer o cálculo de ingestão, em seguida a comida e água foi repostas; foram coletadas amostras de fezes e urina. No dia 1, novamente foram coletadas amostras de urina e fezes, foram pesados a quantidade de comida e medido o volume de água, foi repostas a água e a comida com a suplementação dos respectivos grupos. No dia 2, foram coletadas as amostras de fezes e urina, medido o volume de água e pesado a quantidade de comida remanescente, os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta de órgãos.

5.13.2 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM URINA E FEZES

A urina e as fezes foram coletadas diariamente por tubos coletores encaixados na própria gaiola durante os 3 dias de experimento. A imagem da gaiola pode ser observada na figura 9. As fezes coletadas foram armazenadas em potes coletores de excretas e a urina coletada foi transferida para ependorf e armazenada em freezer a -80°C . Após a coleta, dosou-se o teor de ferro nas amostras a partir do método de fenantrolina descrito por Sampaio (2012)⁽⁶⁵⁾, com modificações.

Para dosar o teor de ferro nas amostras de urina, foram utilizados 500 μL de urina, 1,2 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 4,7, 160 μL de ácido ascórbico e 80 μL de fenantrolina, em seguida o ensaio foi incubado por

20 min à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 5 min e em seguida foi feita leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm.

Para utilizar as fezes no ensaio, as amostras foram primeiramente secas em estufa a 60° C por 24 horas. Em seguida foi feito o ensaio usando 25 mg de amostra seca, 1,7 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 4,7, 160 µL de ácido ascórbico e 80 µL de fenantrolina. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 5 min e em seguida foi feita leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm.

A determinação de ferro nas amostras de urina e fezes foi determinada utilizando-se curva de calibração de fenantrolina ($R^2 = 0.9985$).

5.13.3 ABSORÇÃO APARENTE

A absorção aparente do ferro foi determinada segundo Shiga e colaboradores (2003)⁽⁸⁶⁾, pela seguinte equação:

$$\text{Absorção aparente (mg/dia)} = \text{ingestão de ferro (mg/dia)} - \text{excreção de ferro fecal (mg/dia)}.$$

Para o cálculo da ingestão foi considerado a média do consumo das gaiolas metabólicas.

5.13.4 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM ÓRGÃOS

A retirada do material biológico foi feita no último dia do experimento, sendo retirado o fígado e os rins. Deste modo, os animais foram anestesiados por tiopental sódico (THIOPENTAX®) (2,5%), a anestesia foi administrada na dosagem de 1mL/100 g do peso do animal, em seguida foi feito um deslocamento cervical para a eutanásia do animal. Posteriormente o animal foi posicionado em uma mesa, sob posição decúbito dorsal e foi feita uma incisão abdominal. Os órgãos retirados foram lavados em solução salina 0,9% (p/v) e

foram colocados em potes plásticos esterilizados e armazenados em freezer - 80° C. Após 24 horas, as amostras foram liofilizadas.

Para realizar a digestão dos órgãos foi utilizado a metodologia descrita por Wortmann (2004)⁽⁸⁷⁾ com modificações. Para a digestão do rim foram utilizados 150 mg de rim liofilizado e 1 mL de ácido nitrito P.A, e para a digestão do fígado foram usados 200 mg de fígado em 2 mL de ácido nítrico P.A; ambas as amostras foram submetidas ao ultra-som por 1 hora. Posteriormente as amostras foram armazenadas em estufa de 60° C por 1 hora, com o objetivo de solubilizar e destruir o material orgânica. De cada uma das soluções obtidas, foi transferido 50 µL para eppendorf, e o volume foi completado até 1 mL com água ultrapura. A partir desta solução foi feito a quantificação de ferro em cada amostra. A quantificação foi feita com 500 µL de amostra, 1,2 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 4,7, 160 µL de ácido ascórbico e 80 µL de fenantrolina, em seguida o ensaio foi encubado por 20 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min e em seguida foi feita uma leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm. A determinação de ferro nas amostras de urina e fezes foi medida através da curva de calibração de fenantrolina ($R^2=0.9985$).

5.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes foram conduzidos através de um delineamento inteiramente casualizado, considerando os feijões ETC, HTC e AUT utilizados. Os experimentos foram realizados em triplicata, com repetições, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para a comparação entre as médias. O programa utilizado foi o Statistica 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Ok, USA) e o programa Graphpad Prism 6, com nível de significância de 95 %.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Ao realizar diversos tipos de extração de proteína, devemos primeiramente conhecer a amostra a ser trabalhada, ou seja, é necessário analisar as suas propriedades e características físico-químicas. Portanto é primordial saber o nível de solubilidade proteica, que é determinada não só pela variedade de resíduos de aminoácidos e a forma de dobragem da cadeia peptídica, mas também pelas propriedades do sistema solvente em que a proteína está contida. Neste caso, existem quatro fatores principais que afetam a solubilidade da proteína, os quais influenciam a estrutura secundária e terciária. São eles: a força iônica, pH, temperatura e a constante dielétrica do solvente (88).

Partindo deste conhecimento, os métodos de extração testados foram baseados na solubilidade das proteínas presentes nas amostras e os resultados estão apresentados na tabela 1. A partir das análises estatísticas obteve-se que para o feijão ETC, nos métodos de extração 1 e 2 a quantidade de proteína extraída foi similar, sendo o método 4 o mais eficiente, com valores de $7,8 \text{ mg g}^{-1}$. Em relação ao feijão HTC, o método de extração que obteve mais êxito também foi o método 4, seguido pelo método 3; os métodos de extração 1 e 2 foram menos eficientes e não apresentaram diferença significativa. Nos feijões AUT os maiores teores de proteínas extraídas foram obtidos no método 4, seguido pelo método 3.

Tabela 1: Quantificação de proteínas dos diferentes métodos de extração

Métodos	ETC	HTC	AUT
	(mg/g)		
1	$1,0^c \pm 0,03$	$0,9^c \pm 0,04$	$0,9^c \pm 0,04$
2	$1,6^c \pm 0,11$	$1,2^c \pm 0,07$	$1,1^c \pm 0,06$
3	$4,2^b \pm 0,21$	$2,3^b \pm 0,10$	$2,2^b \pm 0,02$
4	$7,8^a \pm 0,69$	$8,0^a \pm 0,79$	$6,0^a \pm 0,18$

Resultados expressos como médias de três determinações \pm desvio padrão. Na mesma coluna, dados seguidos por letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

O método de extração 1 foi baseado no uso de solvente orgânico combinado com um ácido. Ao utilizarmos esta solução, estamos alterando simultaneamente a camada de solvatação e o ponto isoelétrico das proteínas. A adição de acetonitrila resulta em diminuição da constante dielétrica da fração aquosa da solução extratora, o que altera a polaridade do extrato, acarretando no aumento da solubilidade de proteínas com polaridade mais baixa (88-90). Embora esse método não tenha apresentado maior teor de proteína em relação ao método 4 para o feijão ETC, este método é eficaz para extração de proteínas e peptídeos com caráter anfipático (29).

Os métodos de extração 2 e 3 foram conduzidos com a adição de sais (acetato de sódio e bicarbonato de amônio) e alteração do pH. A estratégia utilizada nestes métodos é alterar a força iônica do meio. Ao levar em conta a solução antes da adição dos sais, os íons na solução encontravam-se rodeados por uma atmosfera de íons de cargas opostas, sendo que esta atmosfera iônica pode causar grandes alterações na solubilidade de uma substância iônica de interesse. Ao adicionarmos os sais como acetato de sódio e o bicarbonato de amônio, a força iônica do meio será aumentada; conseqüentemente haverá uma competição entre a proteína e o soluto pelo solvente aquoso. Deste modo os íons dos sais presentes na solução se ligarão às moléculas de água, impedindo a interação das moléculas de água com a proteína, resultando em uma interação proteína-proteína, às quais se agregam e precipitam. Tal efeito é conhecido como "salting-out" (46, 88). Comparados aos demais métodos, o sal bicarbonato de amônio foi ligeiramente mais eficiente que o sal acetato de sódio para extração de proteínas dos feijões HTC e AUT.

O método de extração 4 foi baseado na solubilização das proteínas do extrato por alcalinização. Sabe-se que extração em pH 8,0 é considerado uma extração de proteínas totais, pois a maior parte das proteínas de leguminosas são solúveis em valores de pH entre 7,0 e 8,0. As famílias de proteínas que são extraídas em pH 8,0 são as globulinas, albuminas e glutelinas (91). E por ser uma solução a base de água, favorece a extração de frações de albumina (92). Por esta razão que este método de extração apresentou maior teor proteico.

6.2 GEL DE ELETROFOROSE SDS-PAGE

A técnica de eletroforese descreve a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico, ou seja, as moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo), e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo). A evidenciação de proteínas e ácidos nucleicos por esta técnica é bastante precisa e importante para diversos estudos, tais como taxonômico, fisiológico, genéticos e entre outros. Na eletroforese a separação das moléculas se dá em função das suas cargas elétricas e também de suas massas moleculares e conformações (93)

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE) revelou o perfil de proteínas e peptídeos extraídos em cada método. A partir da análise do gel mostrado na figura 11, pode-se identificar diferenças no perfil proteico com base na massa molecular. No gel em estudo são evidenciadas proteínas com massas moleculares que variam de 220 a 20 kDa e pequenas frações proteicas com massas moleculares abaixo de 20 kDa.

Comparando os tipos de feijões nos diferentes métodos de extração observa-se que no extrato 1, as bandas peptídicas (± 15 kDa) prevaleceram nos feijões ETC e HTC, e no feijão AUT apresentou bandas peptídicas de tamanho molecular de 6 kDa. Analisando o extrato 2, observa-se que as bandas peptídicas prevaleceram nos feijões ETC e HTC, com massa molecular de aproximadamente 6 kDa. Analisando o feijão ETC e HTC nota-se que no extrato 3 e 4 apresentaram manchas peptídicas abaixo de 21,5 kDa, sendo que estas manchas evidenciam a presença de peptídeos hidrolizados. E para o feijão AUT apresentou bandas nítidas nos extratos 3 e 4 com o mesmo perfil protéico de massa molecular abaixo de 21,5 kDa.

Com esta análise, foi possível identificar que o feijão HTC se destacou dos demais por apresentar maior quantidade de bandas peptídicas em todos os métodos de extração. A presença de peptídeos neste feijão pode ser em virtude do processo de endurecimento, que ocasionou a hidrólise das proteínas (7). E através desta análise foi possível ainda identificar os melhores métodos para extração de peptídeos, que foram os métodos 1, 2 e 3.

Dentre os métodos mais eficientes para extração de peptídeos, o método 1 foi escolhido para a continuação deste trabalho primeiramente por que o número de bandas de massa molecular menor que 20 kDa é maior do

que nos outros métodos de extração, indicando uma maior diversidade de peptídeos neste extrato. Além disto, as atividades testadas neste trabalho foram mais expressivas neste extrato.

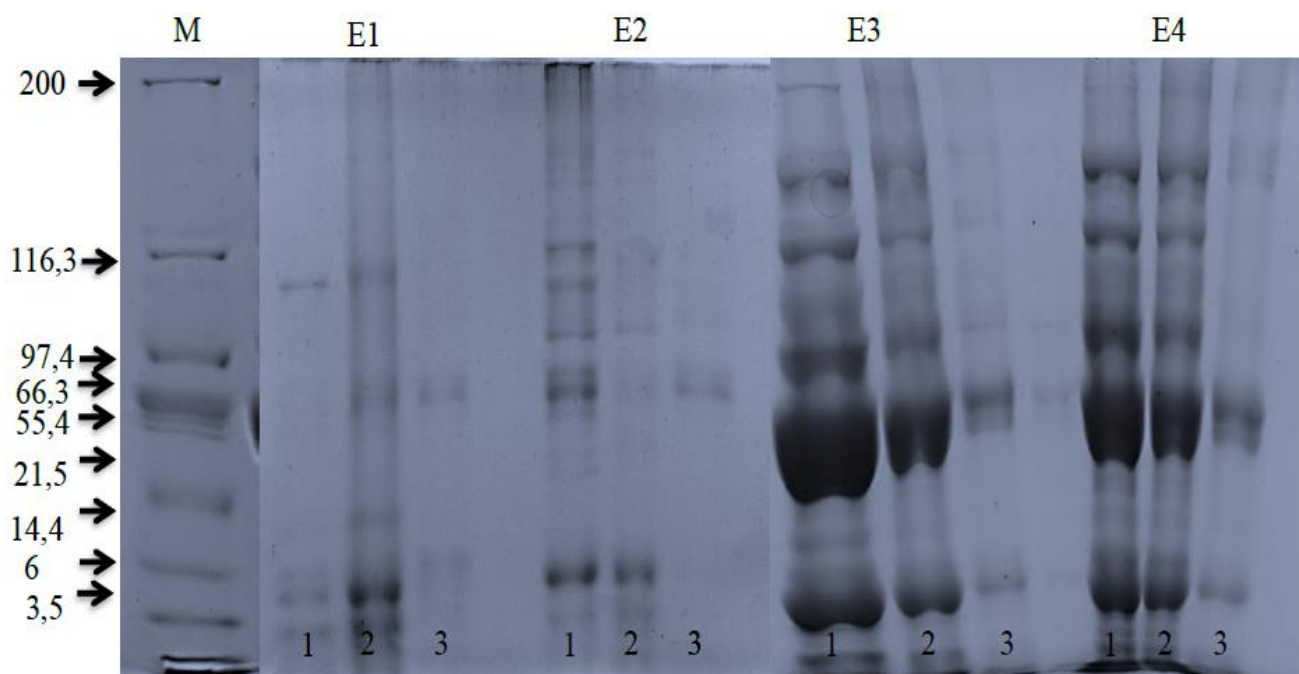


Figura 11: Gel de eletroforese dos extratos obtidos empregando diferentes métodos de extração. Os números: 1- evidencia o feijão ETC, 2- evidencia o feijão HTC, 3- evidencia o feijão AUT. As siglas: M: indica o marcador molecular, E1- representa o extrato 1, E2- representa o extrato 2, E3- representa o extrato 3, E4- representa o extrato 4. A malha do gel de poliacrilamida usada foi 12 %.

6.3. ATIVIDADES QUELANTES

Na natureza é possível encontrar diversos tipos de compostos que atuam como agentes quelantes. Dentre eles podem ser citados os ácidos inorgânicos, ácidos orgânicos bicarboxílicos, fosfatos, vitaminas, aminoácidos e peptídeos. Entre inúmeros compostos quelantes, os peptídeos se destacam por serem ligantes próximos ao ideal, uma vez que em um ambiente aquoso, a molécula protéica se encontra em estado zwitteriônico, com o grupo carboxílico e amino ionizados com cargas opostas, de modo que ambos os grupos são capazes de participar da reação de quelação com o íon de metal (13).

A ligação dos peptídeos a um íon metálico se baseia na interação entre um grupo doador de elétrons situado na superfície da proteína e um íon metálico que apresente um ou mais sítios de coordenação acessíveis, de modo que o complexo formado deve ser biologicamente estável (84).

6.3.1 ATIVIDADE QUELANTE DE COBRE

O cobre é um mineral indispensável para o organismo, pois ele desempenha inúmeros papéis no metabolismo celular. Por esta razão, é necessária a ingestão diária de aproximadamente 2 a 5 mg de cobre para a manutenção da saúde. O cobre desempenha funções tais como prevenção de anemia, de doenças ósseas, de danos celulares, participação na composição de proteínas e enzimas. Em contrapartida, o excesso de cobre também causa danos ao nosso corpo, pois ele produz espécies reativas de oxigênio, induz a quebra da cadeia do DNA e oxida as bases nucleotídicas. Portanto, a ingestão elevada não é adequada, pois além dos danos já citados, o cobre desencadeia doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson (56, 94).

É possível melhorar a absorção e diminuir os efeitos colaterais oriundos do excesso de cobre no organismo usando peptídeos quelantes. Deste modo, o cobre complexado tem maior absorção do que em sua forma livre. Para realizar o ensaio da atividade quelante de cobre foi usado o reagente de cor pirocatecol violeta. Este reagente se liga com os íons de cobre e forma complexos de coloração azul que podem ser quantificados em espectrofotômetro. O princípio deste ensaio baseia-se na reação de agentes quelantes, neste caso peptídeos bioativos, com íons cobre que por não estarem mais disponíveis no meio, deixam de reagir com o pirocatecol violeta levando a um decréscimo na coloração azul proporcional à concentração do agente quelante (13). Na tabela 2 são apresentados os valores de atividade quelante de cobre obtidos nos diferentes métodos de extração.

Tabela 2: Atividade Quelante de cobre dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração.

Métodos	ETC	HTC (%)	AUT
1	80 ^a ±0,02	63 ^b ±0,03	90 ^c ±0,01
2	67 ^b ±0,01	97 ^a ±0,01	97 ^a ±0,00
3	28 ^c ±0,02	34 ^c ±0,01	93 ^b ±0,02
4	28 ^c ±0,04	37 ^c ±0,02	74 ^d ±0,02

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Na mesma coluna, dados seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Os resultados demonstram a presença de atividade quelante em todos os métodos de extração. Comparando os métodos de extração para o feijão ETC ficou evidente que o método 1 de extração foi mais eficiente do que os demais métodos, apresentando 80 % de atividade quelante de cobre. Para o feijão HTC o método 2 foi mais eficaz, resultando em 97% de atividade biológica. Para o feijão AUT os métodos 1, 2 e 3 foram eficientes para a extração de atividade quelante de cobre, apresentando 90 %, 97% e 93 % respectivamente.

Os íons de cobre apresentam alta afinidade por alguns aminoácidos, como os ácidos glutâmico e aspártico, serina, histidina, cisteína, metionina e triptofano. Nesta interação, o cobre se liga a grupos ricos em oxigênio, como o grupo carboxila dos ácido aspártico e glutâmico, e grupos ricos em nitrogênio, como o anel imidazol da histidina, formando assim um complexo metálico(95). Deste modo, é provável que os métodos que apresentaram maiores atividades quelantes de cobre tenham extraído peptídeos que apresentam estes aminoácidos na sua composição.

Outros autores também relataram atividade quelante de cobre em seus ensaios com peptídeos. Carrasco-Castilla et al (2012)⁽⁹⁶⁾ encontraram atividade quelante de cobre em feijão comum (*P. vulgaris*), variedade preto. Em seus ensaios estes autores obtiveram valores de 50,5% de atividade quelante em peptídeos obtidos por hidrólise enzimática, sendo 49,6 % de atividade para peptídeos hidrolisados com massas moleculares maiores que 1 kDa e 79,2 % para peptídeos hidrolisados com massas moleculares menores que 1 kDa. Durak et al (2013)⁽⁷⁶⁾ analisaram atividade quelante de cobre nas frações

protéicas e em hidrolisados de feijão Adzuki. Esses autores relatam atividade quelante com valores de $36,6 \text{ mg mL}^{-1}$ na fração albumina; $5,1 \text{ mg mL}^{-1}$ na fração globulina, $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ na fração prolamina, $16,8 \text{ mg mL}^{-1}$ na fração glutelina e $9,1 \text{ mg mL}^{-1}$ na fração contendo peptídeos hidrolisados.

Ao comparar os resultados deste estudo com alguns autores citados, como por exemplo, os resultados obtidos por Carrasco-Castilla e colaboradores (2012)⁽⁹⁶⁾ nota-se que houve uma diferença de aproximadamente 40% na atividade quelante de cobre comparado a fração proteica do feijão AUT com os peptídeos hidrolisados. Este resultado demonstra que os teores de peptídeos nativos com atividade quelante de cobre presentes em feijão autoclavado são superiores aos relatados na literatura. Neste sentido, considerando esta bioatividade, parece ser mais viável submeter as proteínas e peptídeos presentes em feijão a um processo térmico do que submetê-las a um processo de hidrólise.

6.3.2 ATIVIDADE QUELANTE DE FERRO

Os minerais são essenciais para o organismo humano. Dentre eles, o ferro é um metal importante para a atividade de algumas enzimas e como componente de grupos prostéticos de proteínas como os citocromos, hemoglobina e mioglobina, além de ser também componente das porfirinas. A deficiência do ferro no organismo pode ser resultado de uma má alimentação ou de baixa biodisponibilidade do ferro nos alimentos, e resulta em vários malefícios à saúde, com destaque para a anemia (97)

Outro aspecto apontado como responsável pelo déficit do ferro no organismo é a capacidade de absorção deste elemento. O ferro está presente no organismo sob duas formas: o Fe^{2+} e Fe^{3+} , os quais são capazes de doar e receber elétrons. Entretanto, o Fe^{2+} não é absorvido pelo organismo e precisa ser convertido pela ferrioxidase em Fe^{3+} para assim ter absorção e atuar nas rotas metabólicas. Caso o Fe^{2+} não seja convertido a Fe^{3+} , este pode reagir com ácidos graxos insaturados e induzir a peroxidação lipídica, gerando espécies reativas de oxigênio, acarretando em danos à integridade da célula e morte celular (58).

Deste modo uma das alternativas para melhorar a absorção do Fe^{2+} é a utilização de complexos quelantes obtidos de moléculas orgânicas, como peptídeos, os quais apresentam aminoácidos com carga em pH fisiológico, favorecendo a reação de quelação (60). Guo e colaboradores (2014)⁽¹³⁾ relatam que o produto comercial bisglicinato ferroso, foi desenvolvido por apresentar melhores resultados do que o sulfato ferroso.

No ensaio de atividade quelante de ferro foi utilizada a ferrozina como reagente colorimétrico, uma vez que ela é capaz de formar complexo com o Fe^{2+} livre na solução. Conforme aumenta a quantidade de peptídeos quelantes na solução haverá uma maior competição destes compostos pelos íons de Fe^{2+} livres, desta forma resultando em um decréscimo da quantidade de Fe^{2+} livre para formação do complexo colorido Fe^{2+} -ferrozina. O complexo Fe^{2+} -ferrozina apresenta cor violeta e a presença de peptídeos quelantes é indicada pela redução na cor do ensaio (13).

A atividade quelante das frações proteicas extraídas pelos diferentes solventes estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Atividade quelante de ferro dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração.

Métodos	ETC	HTC (%)	AUT
1	52 ^b ±0,01	75 ^a ±0,02	87 ^b ±0,01
2	53 ^b ±0,04	77 ^a ±0,03	83 ^c ±0,09
3	37 ^c ±0,02	70 ^b ±0,01	95 ^a ±0,01
4	62 ^a ±0,02	65 ^b ±0,01	78 ^d ±0,01

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Na mesma coluna, dados seguidos por letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Ao analisar a atividade quelante de ferro dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração, verificou-se que o extrato do método 4 foi o mais eficaz para o feijão ETC, com valor de 62%, seguido pelo método 1 e 2 com 52 % e 53 % respectivamente, sendo que os extratos destes dois métodos não apresentaram diferença significativa. Para o feijão HTC, os melhores métodos de extração da atividade quelante de ferro foram os métodos 1 e 2,

seguido pelos métodos 3 e 4. Em relação ao feijão AUT, o melhor método de extração foi o método 3 com 95% de atividade quelante, seguido pelo método 1 com 87 %.

Para a formação de um complexo ferro-peptídeo é necessário que haja estabilização dos elétrons de ligação e da carga do íon metálico, tornando assim a carga da molécula nula. Há casos em que íons metálicos podem se ligar ao oxigênio carboxílico por ligações covalentes coordenadas ou iônicas, mas é preferível que haja ligação com um grupo α -amino por meio de ligações covalentes coordenadas (98).

Outro aspecto que deve ser levado em conta ao formar o complexo quelante é a composição de aminoácidos presentes na sequência peptídica. Para que haja a formação do complexo é necessária a presença de aminoácidos específicos que possuem afinidade pelos íons de ferro, dentre eles a histidina, ácido glutâmico, aspártico, cisteína e triptofano. Estes aminoácidos aumentam a absorção do ferro e resultam na redução dos íons férricos para ferrosos. Os grupos OH- da serina ou da treonina também contém sítios de ligação ao ferro, entretanto a histidina e a cisteína são aminoácidos que apresentam maior afinidade devido ao anel imidazol e ao grupo tiol, seguido pelos grupos carboxílicos de ácido glutâmicos e aspárticos, que são grupos de fortes coordenações (84, 99).

Com base nestes dados, pode-se intuir que os diferentes valores de atividade quelante de ferro para os diferentes métodos de extração se deve à extração de peptídeos com variado número destes aminoácidos. É provável então que os métodos 1, 2 e 4 extraíram peptídeos e proteínas com sequências ricas em histidina, cisteína, triptofano, ácido aspártico e glutamato, visto que tais aminoácidos tem alta afinidade para os íons férricos. Ao comparar os tipos de feijão em relação à atividade quelante de ferro, ficou evidente que o feijão AUT apresentou maior porcentagem desta atividade em relação aos demais feijões.

Carrasco-Castilla e colaboradores (2012)⁽⁹⁶⁾ testaram a presença de atividade quelante de ferro para peptídeos obtidos por hidrólise de proteína total extraída de feijão preto e submetidos a fracionamento. Neste estudo foram encontrados valores de 22,9 % de atividade quelante de ferro para a fração hidrolisada total; para as frações com massa molecular maiores que 1 kDa

obteve-se 16,04 % e para as frações menores que 1 kDa 35,83 % de atividade biológica. Nos estudos de Durak et al (2013)⁽⁷⁶⁾ com feijão Adzuki obteve-se 16,98 mg mL⁻¹ de peptídeos hidrolisado com atividade quelante de ferro.

Ao comparar os resultados citados com os resultados deste estudo, pode ser observar maiores teores de atividade quelante de ferro proveniente de peptídeos nativos, evidenciando que é economicamente mais viável o processo de tratamento térmico do que o processo de hidrólise.

6.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O uso de antioxidantes tem crescido bastante nos últimos anos em função das propriedades nutracêuticas que estes compostos desempenham. Por definição, antioxidante é uma substância que se opõem às reações de oxidação ou inibi as ações de espécies reativas de oxigênio e peróxidos. Estes compostos podem ser encontrados em diferentes alimentos de origem vegetal ou animal e no mercado existem também vários antioxidantes sintéticos. No entanto, os antioxidantes sintéticos podem desenvolver efeitos colaterais, de modo que a melhor alternativa é o uso de antioxidantes orgânicos como enzimas, vitaminas, proteínas e peptídeos que são capazes de neutralizar e diminuir a oxidação em tecidos do organismo humano (100).

Os radicais livres são gerados naturalmente no corpo humano durante a respiração e outros mecanismos metabólicos. Estes radicais podem ser utilizados como agentes preventivos de diversos tipos de infecções e como sinalizadores. Entretanto, o seu excesso causa desequilíbrio no organismo, podendo assim gerar danos às células, DNA e proteínas, resultando em doenças como o câncer e aterosclerose (45, 52).

Existem diferentes métodos que são capazes de determinar a capacidade antioxidante tais como, captura de radicais por ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil, teste de ORAC (*oxigen radical absorbance capacity*) usando reagentes fluorescente como a beta-ficoeritrina ou a fluoresceína, além dos testes de ABAP (2,20-azobis-aminopropano) e FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) (100).

Neste estudo foi utilizado o método de DPPH, que é um método baseado na captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil por antioxidantes, que resulta no decréscimo da absorvância em 520 nm.

A presença de atividade antioxidante por DPPH foi testada com os extratos obtidos de diferentes métodos de extração a fim de analisar qual método é mais eficaz para extrair proteínas e peptídeos com atividade antioxidante. Os resultados obtidos estão evidenciados na tabela 4.

Tabela 4: Atividade antioxidante dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração (CAET/ g)

Métodos	ETC	HTC	AUT
1	3,0 ^a ±0,11	4,2 ^a ±0,09	4,0 ^a ±0,21
2	1,8 ^b ±0,10	1,7 ^b ±0,20	3,2 ^{ab} ±0,12
3	1,6 ^b ±0,85	1,2 ^b ±0,87	3,0 ^{ab} ±0,82
4	2,0 ^{ab} ±0,26	0,5 ^b ±0,80	2,3 ^b ±0,07

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Na mesma coluna, dados seguidos por letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Os resultados demonstram que para o feijão ETC as proteínas e peptídeos extraídos pelos métodos 1 e 4 apresentaram maior atividade antioxidante. Já para o feijão HTC o método 1 se destacou dos demais com maior capacidade antioxidante extraída. Também no feijão AUT, o melhor método de extração de proteínas e peptídeos com atividade antioxidante foi o método 1, embora não haja diferença estatística entre este e os métodos 2 e 3.

Os resultados obtidos colaboram com a teoria de que a atividade antioxidante é influenciada pela estrutura, hidrofobicidade e composição de aminoácidos das cadeias proteicas. Como foram utilizados diversos métodos de extração, foram encontrados diversos tipos de proteínas com estruturas diferentes, o que isso influenciou diretamente na atividade antioxidante.

Luna-Vital e colaboradores (2014)⁽⁴⁵⁾ relatam que uma cadeia proteica contendo aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina e aminoácidos básicos como a histidina e arginina resultaram no aumento da atividade antioxidante dos peptídeos formados após a hidrólise enzimática. Estes autores explicam ainda que os resíduos de aminoácidos citados acima

atuam na doação dos prótons aos radicais deficientes de elétrons, e assim mantem a estabilidade molecular da proteína.

Sarmadi e Ismail (2010)⁽⁵²⁾ relataram ainda que o posicionamento correto dos aminoácidos na sequência primária influencia diretamente na atividade antioxidante das proteínas e peptídeos. Eles relatam que na estrutura peptídica contendo Leu-Leu-Pro-His-His apresentou maior atividade antioxidante em virtude da presença da sequência His-His, uma vez que, ao retirar estes resíduos de aminoácidos da região carboxi-terminal da cadeia peptídica a atividade antioxidante foi menor.

6.5 ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Levando em consideração todos os testes realizados, o método de extração 1 foi escolhido para dar continuidade ao trabalho, uma vez que este método resultou em maior número de bandas com massa molecular abaixo de 20 kDa, observadas na eletroforese em SDS-PAGE, o que indica uma maior diversidade de peptídeos que podem apresentar atividade biológica. Esta primeira avaliação se confirmou posteriormente nos testes de atividade quelante de cobre, de ferro e na presença de atividade antioxidante, em que o método de extração 1 resultou em alto teor dos compostos testados. O extrato resultante deste método de extração (E1) foi utilizado nos testes subsequentes.

6.6 TESTES DE INIBIDORES DE ENZIMAS

O uso de alimentos proteicos advindos de leguminosas é bastante alto, uma vez que estes alimentos são relativamente baratos. Entretanto, a digestibilidade de proteínas destes alimentos é afetada pela presença de fatores antinutricionais, dentre eles os inibidores de tripsina e de α -amilase. Os inibidores de tripsina e α -amilase atuam no organismo inibindo estas enzimas digestivas, o que induz a hipersecreção de enzimas pancreáticas, estimula a hipertrofia do pâncreas e além de reduzir a absorção das proteínas e amido presentes na dieta. Dentre as alternativas para reduzir a ação destes inibidores o tratamento térmico é o mais utilizado, já que sendo proteínas, estes inibidores são susceptíveis a desnaturação e perda de atividade (32, 37, 39).

Neste cenário, foi avaliada a presença de inibidores de tripsina e α -amilase no E1 dos grãos de feijão ETC, HTC, AUT, bem como o efeito de tratamento térmico sobre estes inibidores.

Na tabela 5 estão representados os valores obtidos pelos ensaios de atividade de inibidores.

Tabela 5: Teste de atividade de inibidores de enzimas presentes nos extratos obtidos pelo método de extração (E1).

Inibidores	ETC		HTC		AUT	
	(UI/mL)					
	S.T.T	C.T.T	S.T.T	C.T.T	S.T.T	C.T.T
tripsina	44,1 ^b	7,7 ^e	46,8 ^a	9,3 ^d	20,0 ^c	-
	±0,3	±0,31	±0,36	±0,31	±0,25	-
α-amilase	22,8 ^a ±	9,5 ^b	10,8 ^b	-	3,5 ^c	-
	0,6	±1,7	±1,1		±1	

Resultados expressos como médias de três determinações \pm desvio padrão. Na mesma linha, dados seguidos por letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$). Legenda: S.T.T significa sem tratamento térmico; C.T.T significa com tratamento térmico.

Ao comparar os tipos de feijão em relação aos inibidores de tripsina e α -amilase, nota-se que os grãos de feijão AUT apresentaram menores atividades em comparação aos feijões ETC e HTC. Nota-se também que ao submeter os três tipos de feijão ao processo térmico adicional houve uma diminuição significativa na atividade dos inibidores.

Em relação à atividade de inibidor de tripsina o feijão HTC apresentou maior teor (46,8 UI/mL) enquanto que o feijão AUT apresentou menor atividade (20 UI/ mL). Essa diferença é bastante significativa e nos mostra que ao submeter os grãos de feijão ao um processo de autoclavagem houve desnaturação dos inibidores de tripsina, o que conseqüentemente aumenta a qualidade nutricional deste feijão. O tratamento térmico de aquecimento a 80 °C por 15 min foi bastante eficaz na redução da atividade destes inibidores, variando de 44,1 UI/mL a 7,7 UI/ mL para o feijão ETC, de 46,8 UI/mL a 9,3 UI/mL para o feijão HTC, e a completa eliminação destes inibidores no feijão

AUT. Como os inibidores de tripsina são moléculas proteicas, elas são sensíveis ao processo de desnaturação. Ao submeter os inibidores de tripsina à alta temperatura e pressão do processo de autoclavagem pode ter havido quebra das ligações covalentes (dissulfeto) dos inibidores de tripsina mais resistentes à desnaturação térmica (Bowman-Birk), o que explica sua completa eliminação após tratamento térmico subsequente (32). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Batista (2014)⁽²⁸⁾, ao submeter os grãos de feijão comum, variedade Pontal ao processo de autoclavagem, a redução da atividade de inibidor de tripsina foi de 46,5% a 59,9%, dependendo das condições de autoclavagem utilizada. Shimelis e Rakshit (2007)⁽¹⁰¹⁾ também relataram que o processo térmico é bastante eficaz, uma vez que ao submeter os feijões ao processo de autoclavagem obtiveram até 100 % de redução dos inibidores de tripsina.

Em relação aos inibidores de α -amilase nota-se que a atividade deste inibidor de α -amilase diminuiu conforme o feijão foi submetido ao processo de endurecimento e autoclavagem, o qual pode ser observado nos valores 22,8 UI para o ETC; 10,8 UI para o HTC e 3,5 para o AUT. Ao submeter ao processo térmico as atividades dos inibidores de α -amilase reduziram 58,4 % para o feijão ETC, e para o feijão HTC e AUT a redução foi de 100%. Estes resultados corroboram com a teoria que ao submeter o feijão ao tratamento térmico há uma desnaturação do inibidor α -amilase. O processo de desnaturação dos inibidores de α -amilase através do tratamento térmico também foi verificado pelo autor Iguti (1993)⁽¹⁰²⁾. Ele encontrou que a redução da atividade do inibidor se iniciava a temperatura em 45 °C e ao atingir a temperatura de 55 °C a atividade de inibidor é nula.

Alonso et al (2000)⁽¹⁰³⁾ mostraram que a atividade de inibidor de α -amilase foi perdida completamente após o processo de extrusão. Já Batista (2014)⁽²⁸⁾ encontrou em seus testes com feijão comum cultivar Pontal uma redução de 10,8% em feijões autoclavados por 15 min e 42,2 % em feijões autoclavados por 30 min, demonstrando que aumentar o tempo de autoclavagem resulta na diminuição dos inibidores de α -amilase.

Assim, embora estejam presentes no E1, os inibidores de α -amilase e de tripsina podem ter sua atividade reduzida e até eliminada por tratamento a altas temperaturas o que é uma alternativa importante para o reaproveitamento do

feijão comum na alimentação e para explorar as atividades biológicas encontradas neste grão.

6.7 FRACIONAMENTO PROTÉICO

Afim de verificar se as atividades biológicas encontradas nos feijões testados estavam relacionadas com a fração proteica, o E1 foi submetido a processo de fracionamento por ultrafiltração em membrana, que resultou em uma fração contendo proteínas, com massas moleculares maiores que 10 kDa, e uma fração contendo frações peptídicas com massas moleculares menores que 10 kDa. Após fracionamento por ultrafiltração em membrana, as amostras foram submetidas a tratamento térmico e em seguida foram testadas quanto ao conteúdo de proteínas. O tratamento térmico foi utilizado com o intuito de desnaturar os inibidores de tripsina e α -amilase presentes nesta fração e verificar a estabilidade térmica das proteínas e peptídeos bioativos presentes nas amostras, conforme descrito em dados da literatura (1, 9). Os resultados estão expressos na tabela 6.

O E1 foi submetido a fracionamento por ultrafiltração, resultando nas frações $F > 10$ kDa ($F > 10$) que abriga as proteínas e $F < 10$ kDa ($F < 10$), que abriga os peptídeos. Após tratamento térmico, o teor de proteínas e peptídeos foram avaliados nas frações e comparados com o teor antes do tratamento térmico, como mostra a tabela 6.

Tabela 6: Quantificação de proteínas das frações proteicas (mg/g)

Frações	>10 kDa		< 10 kDa	
	S.T.T	C.T.T	S.T.T	C.T.T
ETC	5,0 ^{aA} ±0,68	4,7 ^{aA} ±0,04	1,2 ^{aA} ±0,21	1,2 ^{aA} ±0,01
HTC	2,5 ^{bA} ±0,37	2,8 ^{bA} ±0,49	0,5 ^{bA} ±0,13	0,5 ^{bA} ±0,07
AUT	3,5 ^{abA} ±0,95	2,8 ^{bB} ±0,17	1,7 ^{aA} ±0,3	0,9 ^{aB} ±0,1

Resultados expressos como médias de três determinações \pm desvio padrão. Na mesma coluna, dados por letras minúsculas iguais não diferem significativamente, na mesma linha para cada fração, dados por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$). Legenda: S.T.T significa sem tratamento térmico; C.T.T significa com tratamento térmico

As diferenças no teor de proteínas entre os ETC, HTC e AUT são por causa da solubilidade de proteínas destes feijões. As diferenças podem ser explicadas em virtude da alteração estrutural das proteínas ao serem submetidas aos processos de endurecimento e autoclavagem (8, 104). É sabido que o processo de endurecimento reduz a solubilidade de proteínas, provavelmente por formação de complexos destas moléculas com outras moléculas presentes no feijão (5, 105). Por outro lado, as mudanças de temperatura, umidade e pressão utilizadas no processo de autoclavagem podem ter afetado as ligações covalentes e não covalentes da molécula, ocasionando em um novo rearranjo da estrutura, acarretando na exposição de diferentes resíduos de aminoácidos com diferentes graus de solubilidade (29).

Ao comparar o teor de proteína presente na fração proteica ($F >10$ kDa e $F <10$ kDa), observa-se que os feijões ETC e HTC foram resistentes ao tratamento térmico, uma vez que os teores de proteína se mantiveram, ou seja, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Em contrapartida a fração proteica ($F >10$ kDa) do feijão AUT não foi resistente ao tratamento térmico, onde foi observado um decréscimo de 47 % no teor de proteínas. Na fração proteica ($F <10$ kDa) o mesmo padrão foi observado, o teor de proteína do feijão AUT teve uma redução de 20 % após o tratamento térmico.

Outros autores como Rehman e Shah (2005)⁽¹⁰⁾ relataram em seus estudos que ao submeter os grãos de feijão vermelho e branco à processo térmico e à autoclavagem, reduziram o teor de proteínas assim como foi encontrado neste estudo com as frações proteicas. Nos estudos dos autores citados foi relatada uma redução de 0,86-2,63% no teor de proteínas quando os grãos foram submetidos a tratamento térmico e 1,33-4,58% quando submetido ao processo de autoclavagem a 121°C.

Sabendo que parte da proteína e peptídeos presentes nos feijões foi perdida no tratamento térmico, foram feitos testes de bioatividade a fim de se avaliar a estabilidade térmica destes compostos.

Com relação à atividade quelante de cobre, ao analisar as frações obtidas dos tipos de feijão, observou-se que o feijão AUT apresentou maior porcentagem desta bioatividade em relação aos demais feijões. Os resultados podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7: Atividade quelante de cobre das frações proteicas (%).

Frações	>10 kDa		< 10 kDa	
	S.T.T	C.T.T	S.T.T	C.T.T
ETC	30 ^{bB} ±0,01	42 ^{bA} ±0,02	51 ^{bB} ±0,05	65 ^{bA} ±0,05
HTC	30 ^{bB} ±0,05	42 ^{bA} ±0,06	51 ^{bB} ±0,05	65 ^{bA} ±0,02
AUT	40 ^{aB} ±0,12	44 ^{aA} ±0,01	82 ^{aA} ±0,02	83 ^{aA} ±0,02

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Na mesma coluna, dados por letras minúsculas iguais não diferem significativamente, na mesma linha para cada fração, dados por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$). Legenda: S.T.T significa sem tratamento térmico; C.T.T significa com tratamento térmico

Após tratamento térmico as frações apresentaram significativo aumento das atividades quelantes, exceto na F <10 de feijão AUT. Para o feijão ETC na F >10 houve um aumento de 12% na atividade quelante, que passou de 30 para 42%, enquanto que na F <10 este aumento foi de 14% (de 51 para 65%). Para o feijão HTC o aumento foi de 12% na F >10 e de 14% na F <10. No feijão AUT o aumento na atividade quelante só foi observado na F >10, que aumentou de 40 para 44%. Provavelmente o tratamento térmico promoveu a solubilização de peptídeos e proteínas ou expôs aminoácidos responsáveis por esta atividade antes internalizados na estrutura polipeptídica. Os resultados encontrados para a atividade quelante de ferro das frações proteicas estão expressos na tabela 8.

Tabela 8: Atividade Quelante de ferro das frações proteicas (%).

Frações	>10 kDa		< 10 kDa	
	S.T.T	C.T.T	S.T.T	C.T.T
ETC	33 ^{cB} ±0,03	50 ^{cA} ±0,00	72 ^{cB} ±0,03	84 ^{cA} ±0,03
HTC	64 ^{bB} ±0,03	83 ^{bA} ± 0,03	90 ^{bA} ±0,01	90 ^{bA} ±0,01
AUT	96 ^{aA} ±0,00	94 ^{aB} ±0,01	97 ^{aA} ±0,03	94 ^{aB} ±0,00

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Na mesma coluna, dados por letras minúsculas iguais não diferem significativamente, na mesma linha para cada fração, dados por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$). Legenda: S.T.T significa sem tratamento térmico; C.T.T significa com tratamento térmico.

Novamente o feijão AUT destacou-se, desta vez com o maior teor de atividade quelante de ferro. Também de modo similar ao que ocorreu com a atividade quelante de cobre, houve um aumento da atividade quelante de ferro nos feijões submetidos ao tratamento térmico. Para o feijão ETC obteve-se um aumento de atividade de 17% na F >10 e de 12% na F <10, enquanto que para o feijão HTC verificou-se aumento de 19% da atividade na F > 10. Falar que a submeter ao tratamento caem e são significativos

É provável que ao submeter os feijões ao tratamento térmico as estruturas das proteínas e peptídeos tenham sofrido um rearranjo, tornando expostas maiores quantidade de sítios de ligações para o íon ferro. A atividade antioxidante das frações proteicas está apresentada na tabela 9.

Tabela 9: Atividade Antioxidante das frações proteicas (CAET/g⁻¹ de proteína)

Frações	>10 kDa		< 10 kDa	
	S.T.T	C.T.T	S.T.T	C.T.T
ETC	12,4 ^{aA} ±0,36	12,8 ^{aA} ±0,11	18,3 ^{cA} ±0,07	19,5 ^{cA} ±1,31
HTC	10,5 ^{bA} ±0,21	9,6 ^{cA} ±1,16	24,2 ^{bB} ±0,21	29,9 ^{bA} ±0,41
AUT	13,1 ^{aA} ±0,65	11,6 ^{bB} ±0,5	27,3 ^{aB} ±0,10	32,6 ^{aA} ±0,26

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Na mesma coluna, dados por letras minúsculas iguais não diferem significativamente, na mesma linha para cada fração, dados por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente (p >0,05). Legenda: S.T.T significa sem tratamento térmico; C.T.T significa com tratamento térmico

Os resultados encontrados para a F >10 mostram que os feijões que apresentaram maiores atividades antioxidante foram o AUT com 13,1 CAET g⁻¹ antes de submeter ao tratamento térmico e 11,6 CAET g⁻¹ após submissão ao tratamento térmico, seguido pelo feijão ETC com aproximadamente 12 CAET g⁻¹ antes e depois do tratamento térmico. Para a F <10 o feijão que apresentou maior teor de peptídeos bioativos foi o feijão AUT com 27,3 CAET g⁻¹, que aumentou para 32,6 CAET g⁻¹ após o tratamento térmico. Já o feijão HTC apresentou valores entre 24,2 – 29,9 CAET g⁻¹.

Conforme dito anteriormente, a atividade antioxidante é influenciada pela estrutura, composição de aminoácidos e hidrofobicidade. Em vista destes

aspectos, ao comparar a F <10 com as demais frações (E1 e F >10), nota-se que os peptídeos se destacam por serem mais bioativos.

Alguns pesquisadores testam peptídeos hidrolisados quanto a atividade antioxidante a fim de encontrar a melhor sequência de aminoácidos para desenvolver com maior eficácia esta atividade biológica. Luna-Vital e colaboradores (2015)⁽¹¹⁾ encontraram atividade antioxidante usando DPPH em peptídeos hidrolisados de feijão comum (*P. vulgaris*) na faixa de 748,4 a 50 de CAET g⁻¹, enquanto Carrasco-Castilla e colaboradores (2012)⁽⁹⁶⁾ encontraram atividade antioxidante de peptídeos hidrolisados do feijão comum pelo método de ABTS em torno de 8,77 CAET g⁻¹ de proteína.

6.8 CAPACIDADE DE QUELAR COBRE E FERRO POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PEPTÍDEOS

A capacidade quelante de um polipeptídeo com um metal se dá pela interação entre um grupo doador de elétrons presente na superfície da proteína e um íon metálico que apresenta um ou mais sítios de coordenação acessíveis (99). A ligação entre um peptídeo e um metal, se dá pelo nitrogênio do grupo α -amino ou o oxigênio do grupo carboxílico dos aminoácidos com os íons dos metais, formando o complexo. Deste modo ao ligar íons e peptídeo ocorre a neutralização da carga positiva do íon de metal em decorrência da formação da ligação iônica, covalente ou covalente coordenada (98).

O complexo quelante é especificado pelo arranjo espacial de resíduos de aminoácidos presente na sequência peptídica. As interações entre os ligantes podem ser aumentadas ou diminuídas de acordo com o tipo de resíduo de aminoácidos presente na sequência peptídica (89). Assim, a capacidade quelante de um dado peptídeo dependerá de sua composição de aminoácidos e o nível de exposição do grupo ligante do aminoácido, determinado pelo arranjo tridimensional do peptídeo.

Deste modo, foi analisada a capacidade dos peptídeos presentes na F<10 kDa do feijão ETC, HTC e AUT em quelar íons de cobre e ferro, variando as concentrações de frações proteicas em um meio contendo concentrações fixas de 10 μ g de cobre e 1,12 mg de ferro.

A tabela 10 mostra os dados obtidos a partir do teste de capacidade de quelar íons de cobre. Nestes dados observa-se que o feijão HTC quelou 100 %

os íons de cobre com a concentração de 40 µg de proteína. Enquanto que o feijão AUT quelou com 50 µg de proteína e o feijão ETC quelou completamente com a concentração de 60 µg.

Tabela 10: Quantidade de peptídeos necessário para quelar 100% dos íons de cobre.

Quantidade de proteína (µg de peptídeo)	ETC	HTC	AUT
	(Capacidade quelante %)		
10	91,5 ^{Bc} ±0,11	88,5 ^{Cd} ±0,24	98,7 ^{Ab} ±0,23
20	96,2 ^{Bb} ±0,53	94,9 ^{Cc} ±0,22	98,8 ^{Ab} ±0,09
30	96,9 ^{Cb} ±0,53	97,5 ^{Bb} ±0,98	98,9 ^{Ab} ±0,09
40	97,8 ^{Cb} ±0,32	99,8 ^{Aa} ±0,65	99 ^{Bb} ±0,49
50	99,1 ^{Bab} ±1,0	100 ^{Aa} ±0,87	100 ^{Aa} ±0,23
60	100,8 ^{Aa} ±1,3	100,3 ^{Ba} ±0,15	100 ^{Ca} ±1,09

Resultados expressos como médias de três determinações e ± desvio padrão. Na mesma linha, dados por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente; e na mesma coluna, dados por letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($p > 0,05$).

A tabela 11 revela os resultados obtidos a partir do teste de quelação de íons de ferro variando a concentração de peptídeo. Neste teste obteve-se que o feijão AUT apresentou 100 % de quelação com a concentração de 40 µg. Enquanto que os feijões ETC e HTC necessitaram de 60 µg de proteína para quelar 100% de íons de ferro.

Tabela 11: Quantidade de peptídeo necessário para quelar 100% dos íons de ferro.

Quantidade de proteína (μg de proteína)	ETC	HTC	AUT
	(Capacidade quelante %)		
10	90,9 ^{Bd} \pm 0,1	97,4 ^{Ad} \pm 0,3	66,1 ^{Cd} \pm 0,3
20	96,2 ^{Bc} \pm 1,6	97,9 ^{Ad} \pm 0,5	71,4 ^{Cc} \pm 0,7
30	96,5 ^{Cc} \pm 0,0	99 ^{Ac} \pm 0,5	97,8 ^{Bb} \pm 0,1
40	96,8 ^{Bbc} \pm 0,4	99,2 ^{Ab} \pm 0,1	99,5 ^{Aa} \pm 0,1
50	98,2 ^{Bab} \pm 0,4	99,7 ^{Aab} \pm 0,4	99,8 ^{Aa} \pm 0,1
60	100,2 ^{Aa} \pm 0,1	100,1 ^{Aa} \pm 0,3	100,3 ^{Aa} \pm 0,2

Resultados expressos como médias de três determinações e \pm desvio padrão. Na mesma linha, dados por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente; e na mesma coluna, dados por letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($p > 0,05$).

Estes dados nos mostram que a utilização de frações proteicas advindos de uma simples extração seguido de um fracionamento, sem a necessidade de uma hidrólise enzimática, é mais vantajoso, uma vez que se utiliza baixo teor de peptídeos para quelar 100 % de íons de cobre e ferro. Isso nos leva a relatar que é possível adquirir frações proteicas sem hidrólise enzimática com sítios de ligações disponíveis à doação de elétrons, com intuito de formar um sitio de coordenação com um íon metálico, conseqüentemente formando um complexo peptídeo-metálico (99).

Nos testes feitos com o íon de cobre observa-se que foi possível utilizar 50 μg de proteína do feijão AUT para ter 100 % de quelação de íons de cobre, o mesmo teor de proteína utilizado por Carrasco-Castilla e colaboradores (2012)⁽⁹⁶⁾ que apresentaram 78,2 % de quelação utilizando fração proteica menor que 1 kDa de hidrolisado de proteína isolada. Outros autores também tiveram resultados inferiores comparados aos resultados obtidos neste estudo, os autores como Durak e colaboradores (2013)⁽⁷⁶⁾ utilizaram 1,7 mg/mL para ter 100% de quelação de íons de cobre. Tais resultados evidenciam que a utilização de frações proteicas dos feijões ETC, HTC e AUT apresentaram maior capacidade em quelar íons metálicos. Os resultados mostraram ainda que ao submeter o feijão recém colhido ao processo de endurecimento

contribuiu com o aumento da capacidade quelante de cobre; o que pode ser explicado que durante o processo de endurecimento as moléculas de proteínas sofrerão uma reorganização da sua estrutura, expondo aminoácidos com afinidade aos íons de cobre (89).

Já nos testes com os íons de ferro, pode-se dizer que a fração peptídica menor que 10 kDa de feijões AUT apresentou maior capacidade de quelar íons de ferro, uma vez que foram necessárias 40 µg desta fração para se obter 100% de quelação do ferro presente na solução. Os resultados apresentados são explicados pelo fato dos peptídeos presentes no feijão AUT terem sofrido alterações em sua estrutura em decorrência do processo de autoclavagem, o que deve ter resultado na exposição de sítios de ligações contendo aminoácidos com carga negativa ou positiva, como aspartato, glutamato e histidina, carregados na superfície da molécula, permitindo maior interação com os íons de ferro (84).

Estes resultados demonstram que é mais vantajoso a utilização de peptídeos nativos do que peptídeos hidrolisados para quelar íons de ferro, uma vez que se utiliza a metade de teor de peptídeo para formar quelatos comparados com os autores descritos na literatura, como Carrasco-Castilla e colaboradores (2012)⁽¹⁷⁾, que testaram a capacidade quelante das frações de feijão comum, a saber, isolado de proteína hidrolisada, hidrolisado de lectina e hidrolisado de faseolina. Nestes testes foram utilizadas 100 µg de cada fração protéica para obter 20, 30 e 80% de atividade quelante de ferro, respectivamente. Em estudos feitos por Torres-Fuentes e colaboradores (2012)⁽⁶⁰⁾ foram utilizados também 100 µg de frações protéicas oriundas de hidrólise enzimática de proteína de grãos de bico e obtiveram 40% de capacidade de quelar ferro para primeira fração, 30% para a segunda e terceira fração e 15% para proteína hidrolisada.

6.9 ESTABILIDADE DO COMPLEXO PEPTIDEO-METÁLICO ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS

O nosso organismo não possui mecanismo fisiológico para eliminar ferro e cobre em excesso. Deste modo, a absorção de ferro e cobre geralmente é regulada para evitar o acúmulo destes íons (106). Uma das barreiras para a absorção dos íons metálicos é a manutenção do quelato no trato digestivo. O

principal ponto de controle é o estômago em função da ação combinada da enzima pepsina e o pH extremamente ácido deste compartimento (107).

O primeiro passo para se garantir a absorção de ferro e cobre pelo organismo é verificar a estabilidade gástrica dos quelatos produzidos durante a passagem no trato gastrointestinal. Os complexos peptídeo-metálico formados a partir de peptídeos dos feijões ETC, HTC e AUT foram submetidos à digestão gástrica *in vitro*, com o intuito de avaliar a estabilidade da ligação Fe^{2+} -peptídeo e Cu^{2+} -peptídeo.

Com intuito de avaliar a estabilidade do complexo peptídeo-cobre, foi feito um ensaio submetendo o complexo formado ao pH estomacal associado à ação da pepsina, e também um ensaio contendo apenas o pH estomacal. Se as ligações que estabilizam o complexo forem fracas o complexo pode se desfazer nas condições estomacais, ocorrendo o rompimento da ligação Cu^{2+} -peptídeo. Nesse caso, o cobre se dissociará do peptídeo e permanecerá solúvel após o ajuste do meio para o pH 6,0 ficando susceptível à ligação com o reagente pirocatecol violeta adicionado após o ensaio.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciaram que a estabilidade do complexo peptídeo-cobre frente as condições ácidas e enzimáticas do meio se manteve após o teste. Neste teste foi possível observar que a ligação entre o peptídeo e os íons de cobre do complexo quelante advindos dos feijões ETC, HTC e AUT foram resistentes às condições gástricas permanecendo com mais da metade da atividade quelante de cobre. Estes resultados podem ser observados na tabela 12.

Tabela 12: Estabilidade do complexo cobre-peptídeo após as condições gástricas

	ETC	HTC	AUT
Antes	90,8 ^{Ab} ±0,54	87,4 ^{Ac} ±0,76	93,2 ^{Aa} ±0,09
pH 2,0+ pepsina	76,5 ^{Cc} ±0,17	78,3 ^{Bb} ±0,86	83,5 ^{Ca} ±0,61
pH 2,0	82,6 ^{Bb} ±0,84	79,1 ^{Bc} ±1,09	88,1 ^{Ba} ±3,43

Resultados expressos como médias de três determinações e \pm desvio padrão. Na mesma coluna, dados por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente; e na mesma linha, dados por letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($p > 0,05$).

Nota-se ainda que ao comparar os três tipos de feijão observa-se que o feijão AUT foi o mais resistente às condições gástrica, apresentando 90% de manutenção da atividade quelante de cobre mesmo após ser submetido à ação da enzima pepsina e da solução ácida. A estabilidade do complexo peptídeo-cobre do feijão AUT é explicado pela presença de certos aminoácidos (histidina, serina, aspartato, metionina, glutamato e triptofano) na superfície da molécula, que podem ter ficado expostos após o tratamento de autoclavagem, tais aminoácidos apresentam alta afinidade com os íons cobre, resultando numa ligação forte (95).

A avaliação do complexo peptídeo-ferro baseou-se no fato de que o ferro livre é solúvel em pH ácido, mas é insolúvel em pH 7,0. Portanto, caso o pH estomacal associado à ação da pepsina promova o rompimento da ligação Fe^{2+} -peptídeo, se o ferro estiver apenas fracamente ligado ao peptídeo, o ferro liberado precipitará após o ajuste de pH para 7,0. A ausência de precipitado foi um forte indicativo da estabilidade do complexo.

A estabilidade do complexo ferro-peptídeo após as condições gástricas com a enzima pepsina e sem a enzima pepsina foi mantida. Os resultados mostraram que os complexos peptídeo-ferro dos feijões ETC, HTC e AUT obtiveram valores superiores a 80% de estabilidade frente as condições testadas. Estes resultados podem ser visualizados na tabela 13.

Tabela 13: Estabilidade do complexo ferro-peptídeo após as condições gástricas.

	ETC	HTC	AUT
Antes	98,6 ^{Aa} ±0,09	97,8 ^{Ab} ±0,07	95,2 ^{Ac} ±0,07
pH2,0+ pepsina	90,3 ^{Ca} ±0,4	90 ^{Cab} ±0,5	89,2 ^{Bb} ±0,3
pH 2,0	95,2 ^{Ba} ±0,2	91,7 ^{Bb} ±0,3	89,8 ^{Bc} ±0,3

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna, dados seguidos por letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Os resultados para o complexo peptídeo-ferro dos feijões ETC, HTC e AUT foram superiores em relação aos resultados encontrados por Silva (2013)⁸¹, em seus testes realizados com peptídeos do soro do leite onde foi

analisado a estabilidade do complexo ferro-peptídeo às condições gástricas; o autor encontrou uma faixa de 40,1 a 59% de estabilidade. Deste modo o autor sugere que mais de 40% do ferro está quelado, o que diminui a formação de hidróxidos insolúveis e potencialmente eleva sua biodisponibilidade.

Estes resultados demonstraram que os complexos peptídeos-metálicos formados a partir de peptídeos de feijão ETC, HTC e AUT foram estáveis às condições gástricas, ou seja, a ligação formada entre o peptídeo e o metal se manteve estável mesmo após passar por incubação em pH ácido e com a presença da pepsina. A resistência da ligação peptídeo-metal é caracterizada pelo tipo de ligação que foi formada. Neste caso, pode haver a combinação entre íons metálicos duros (íons caracterizados por pequeno raio e grande carga) com um ligante duro formando um complexo estabilizado por simples forças eletrostáticas; ou pode haver ainda a ligação dos íons metálicos com ligantes macios acarretando a formação de uma nuvem eletrônica polarizada, a qual permite o partilhamento dos íons e um aumento na covalência da ligação, formando um complexo com alta estabilidade (108).

Outro fator que contribui com a estabilidade da ligação do complexo peptídeo-metálico é o número de ligações do ligante com o íon metálico, seja cobre ou ferro. A estabilidade do complexo formado é mais alta quando ocorre a ligação por mais de 2 átomos do ligante ao íon metálico, deste modo a resistência do complexo é maior (109).

Portanto conclui-se que o peptídeo confere proteção aos íons de ferro e cobre frente às condições gástricas. Espera-se que os complexos peptídeo-ferro e peptídeo-cobre impeçam o contato dos íons de cobre e ferro com a mucosa do estômago a fim reduzir o potencial de irritabilidade gástrica observado em formulações a base de sais de ferro e cobre, como o sulfato ferroso e sulfato de cobre. Espera-se que as formas de complexo peptídeo-ferro e peptídeo-cobre confirmem maior absorção destes íons. Esta absorção pode ocorrer por várias rotas metabólicas, dependendo do aminoácido quelante presente no peptídeo. Uma vez absorvido, mesmo que em pequenas quantidades, estes complexos são capazes de manter o sistema fisiológico em homeostasia (110).

6.10 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

6.10.1 QUANTIDADE DE INGESTA E EXCREÇÃO DE FERRO

Grande parte da ingesta de ferro na alimentação não é absorvida uma vez que a forma como o ferro é disponibilizado no alimento não é aproveitada por ser insolúvel em meio fisiológico (111). Todo indivíduo necessita em torno de 10- a 20 mg de ferro ingerido, para manter a homeostasia do corpo e prevenir doenças. Por ser um importante cofator de enzimas e proteínas, e participar de várias rotas metabólicas, o ferro é indispensável na alimentação (112).

Sendo assim foi realizado a avaliação da quantidade de ferro ingerida em cada grupo experimental. A dieta de caseína por 48 h teve como objetivo promover total excreção de ferro do trato gastrointestinal dos animais. Desse modo a ingesta de ferro foi feita no último dia experimental. Os resultados obtidos evidenciaram que o grupo do quelato comercial e do complexo peptídico ingeriram a mesma quantidade de ferro, enquanto que o grupo do ferro inorgânico ingeriu 1 mg de ferro por grama (tabela 14). O grupo de caseína não ingeriu nenhum teor de ferro, uma vez que sua suplementação foi isenta de ferro e os animais do grupo da ração ingeriram 205 mg de ferro por grama. Estes resultados podem ser observados na tabela 14.

Tabela 14: Média da quantidade de ingesta de ferro de cada grupo experimental.

Grupo experimental	Quantidade de ingesta (mg/g)
Caseína	0 ^d
Ração	205 ^a ±10
Quelato comercial	2,0 ^b ±0,07
Complexo Peptídico	2,1 ^b ±0,07
Ferro inorgânico	1,1 ^c ±0,1

Resultados expressos como médias de 4 determinações ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna, dados seguidos por letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Conforme foi abordado, nem todo ferro ingerido é absorvido. Barrios e colaboradores (2000)⁽⁶⁹⁾ relata que parte da quantidade de ferro ingerido é eliminada através do material fecal, da mucosa intestinal (ferritina), pela bile, via urinária e por descamação cutânea. A excreção e a absorção de ferro no organismo são influenciadas por vários fatores, tais como necessidades nutricionais individuais, os estados fisiológicos, a integridade e a boa regulação do trato gastrointestinal (113-114). Deste modo qualquer anormalidade que surgir pode alterar a absorção e a excreção de ferro no corpo. O ferro é utilizado ao máximo pelo organismo, o excesso dele é eliminado por meio das fezes (67).

Diante destes conceitos foi feito uma avaliação do nível de ferro eliminado pelas duas principais vias de excreção (urina e fezes). Os resultados mostraram que o grupo da caseína, quelato comercial e ferro inorgânico não apresentaram teor de ferro em fezes. Por outro lado, o grupo alimentado com ração apresentou 20 ($\pm 0,02$) mg de ferro excretado e o grupo de peptídeos quelados apresentou 1,8 ($\pm 0,08$) mg de ferro excretado. Considerando o grupo alimentado com o complexo peptídico, foi observado que a quantidade de ferro ingerida pelos animais foi toda excretada no material fecal. Em relação a via urinária, não foi encontrado nenhum teor de ferro nos grupos experimentais (figura 12).

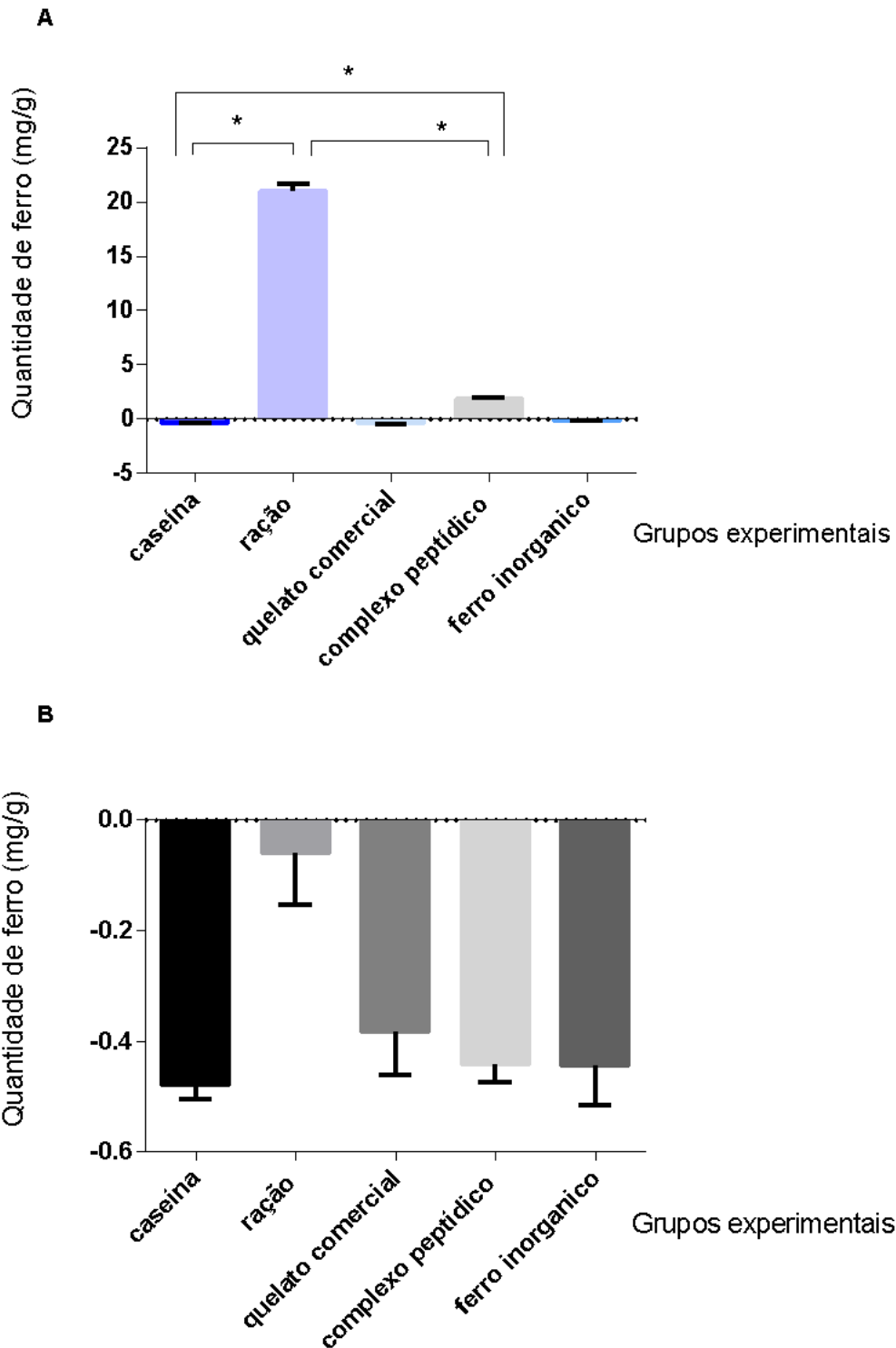


Figura 12: Teor de ferro eliminado nas principais vias de excreção (fezes e urina). A figura com letra A mostra os resultados obtidos a partir da quantificação de ferro em fezes; nesta figura as barras com asteriscos demonstram que houve diferença significativa entre o grupo da caseína e a ração com o grupo do complexo peptídico ($p > 0,05$). A letra B está evidenciando os resultados obtidos a partir da quantificação de ferro em urina. Neste experimento o n utilizado foi 4. Fonte: o autor.

6.10.2 ABSORÇÃO APARENTE

O ferro é considerado um elemento essencial para o controle homeostático para os organismos vivos. Desta forma é essencial que haja um ciclo de reposição de ferro para os precursores de eritrócitos na medula óssea e em outros tecidos. Em média um adulto apresenta em seu corpo 2-4 g de ferro, desta quantidade, grande parte está ligada à hemoglobina de eritrócito sanguíneos e uma pequena quantidade é armazenada nos tecidos hepáticos, na medula óssea, baço e músculos (111).

A absorção do ferro ocorre no intestino, especificamente no duodeno proximal. Este ferro estando na forma férrica (Fe^{3+}) consegue ser absorvido pelos enterócitos duodenais e consequentemente é direcionado às células-alvos. Partindo deste conhecimento, o cálculo da absorção aparente de ferro foi realizado pela diferença entre a quantidade de ferro excretado e a quantidade de ingesta de ferro. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Absorção aparente do ferro em animais experimentais.

Grupo experimental	Absorção aparente (mg/g)
Caseína	0 ^c
Ração	185,1 ^a ± 8,8
Quelato comercial	1,8 ^b ± 0,6
Complexo Peptídico	-0,1 ^c ± 0,05
Ferro inorgânico	0,9 ^b ± 0,08

Resultados expressos como médias de 4 determinações ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna, dados seguidos por letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Como pode ser observado na Tabela 15, apenas os grupos de ração, quelato comercial e ferro inorgânico apresentaram absorção de ferro. O grupo da ração foi o grupo que apresentou maior absorção, fato explicado em função do alto teor de ferro encontrado na ração, o que contribuiu para a maior absorção. Entretanto este resultado não significa que o alto teor de ferro absorvido foi favorável ao metabolismo do animal. Conforme relatado por Galaris e colaboradores (2008)⁽¹¹⁵⁾ altos teores de ferro no organismo podem causar envelhecimento celular, uma vez que o ferro livre atua como catalisador de reações responsáveis pela oxidação de componentes celulares em situações de estresse oxidativos.

Em contrapartida a quantidade de ferro absorvida pelos grupos de quelato comercial e ferro inorgânico foram suficientes para o organismo do rato, conforme é descrito Nutrient Requirements of laboratory Animals (1995)⁽⁸⁵⁾ onde a faixa de ferro ideal para ratos é de 35-100 mg/kg por dia.

No que se refere ao grupo do complexo peptídico, não houve absorção evidenciando que o ferro ingerido foi totalmente eliminado pelas fezes. Apesar da complexação com peptídeos aumentar a estabilidade do ferro às condições gástricas, o tamanho molecular do complexo ferro-peptídeo comprometeu a sua absorção, uma vez que moléculas de alto tamanho molecular não são capazes de atravessar as membranas dos enterócitos (116).

Ashmead (1991)⁽¹¹⁶⁾, explica a partir de seus testes que quando o complexo quelante com peptídeos tem peso molecular em torno de 200 a 400 Daltons a sua absorção é mais rápida do que íons de ferro livre e a sua forma se mantém intacta, não sofrendo ação de hidrólise na mucosa do lúmen intestinal. Ao ser absorvido o complexo quelante se dissocia quimicamente do íon de ferro, liberando esse metal para ligação com ferritina ou a transferrina. O mesmo fato citado foi encontrado por Eckert e colaboradores (2016)⁽⁶³⁾ utilizando um hexapeptídeo, em seus estudos o complexo ferro-peptídeo teve boa absorção e contribuiu para o aumento dos níveis de ferritina no sangue.

6.10.3 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM ÓRGÃOS

O ferro está amplamente distribuído no organismo, mas sua distribuição não é uniforme. Geralmente, 60 % do estoque de ferro no corpo está presente no fígado e os 40 % restante estão presentes nos tecidos musculares e nas demais células. O ferro que está presente no fígado está ligado a ferritina e a hemossiderina, que são proteínas de armazenamento. A ferritina é uma apoferritina com núcleo férrico, que se encontra solúvel em meio fisiológico enquanto que a hemossiderina é a forma degradada da ferritina, sendo insolúvel em meio fisiológico. Desse modo, o ferro só é armazenado sob a forma de hemossiderina quando os estoques de ferro no organismo estão elevados (117).

Como o fígado e o rim são órgãos alvos de armazenamento de ferro, foi realizada a quantificação de ferro em tecido hepático e renal, com intuito de

verificar o acúmulo de ferro nestes tecidos. Como pode ser observado na figura 13, não houve excesso de ferro nos rins e no fígado dos animais de cada grupo experimental. A ausência de ferro nos tecidos analisados, pode ser em virtude do ferro estar ligado a transferrina na corrente sanguínea, ou ligado aos eritrócitos (63).

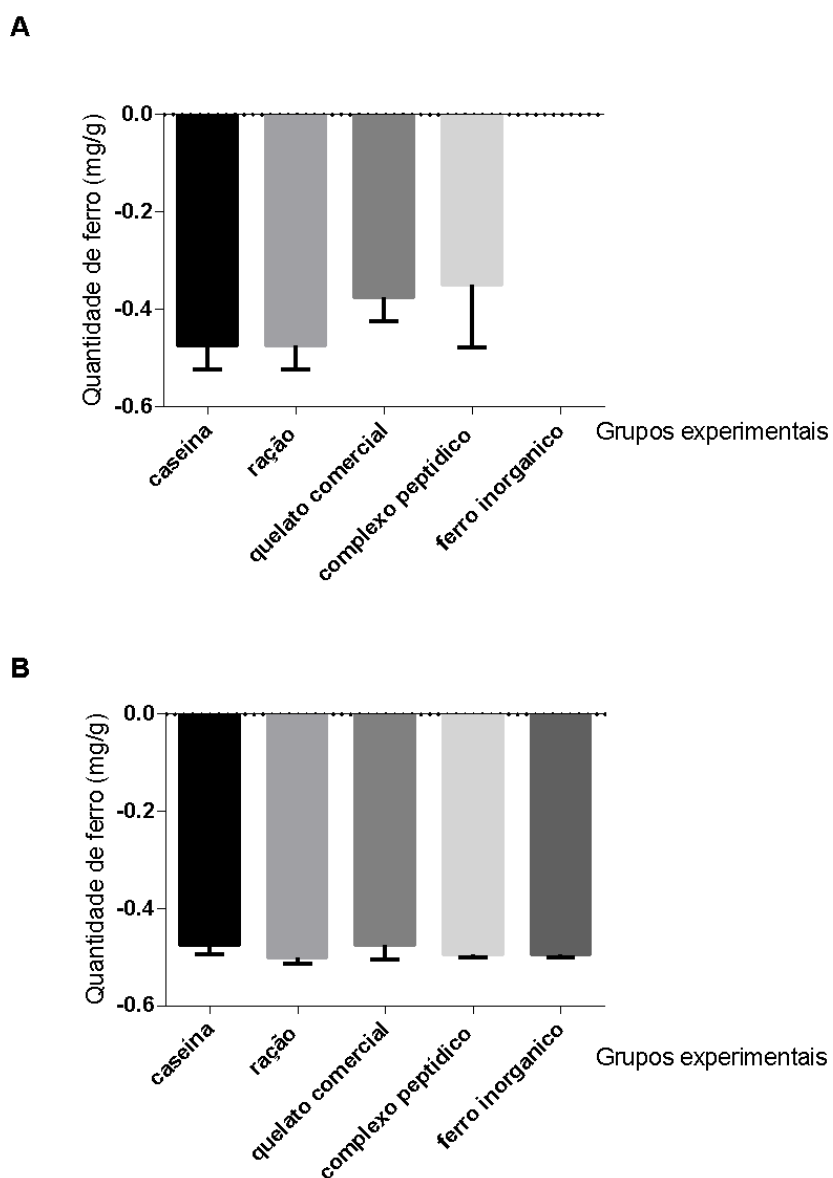


Figura 13: Teor de ferro encontrado em tecido hepático e renal. O painel A mostra os resultados obtidos a partir da quantificação de ferro nos rins, e no painel B está evidenciando os resultados obtidos a partir da quantificação de ferro no fígado. Neste experimento o n utilizado foi 4. Fonte: o autor.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho evidenciaram a presença de frações proteicas de ocorrência natural em feijão comum (*P. vulgaris*) com atividade biológica. Dentre os métodos de extração proteica testados, o método que apresentou melhor perfil de atividade antioxidante, quelante de cobre e ferro foi o método 1.

Considerando as frações proteicas obtidas pelo método de extração 1, o feijão que apresentou maior atividade biológica foi o feijão AUT, evidenciando que o processo de autoclavagem influenciou no rearranjo das moléculas de proteína, permitindo a exposição de aminoácidos que favorecem a atividade quelante de ferro, quelante de cobre e antioxidante.

Após fracionamento, as frações proteicas com massa molecular menor que 10 kDa possuem maior atividade biológica, e verificou-se ainda que os peptídeos analisados são resistentes à altas temperaturas, uma vez que ao serem submetidos ao tratamento térmico a sua atividade biológica é aumentada, em virtude do rearranjo estrutural da molécula, provavelmente permitindo a exposição de sítios de ligação.

A utilização das frações proteicas ($F < 10$ kDa) para elaboração de quelatos de metais (cobre e ferro) permitiu a produção de complexos com alta estabilidade às condições gástricas, sendo evidenciado que os complexos ferro-peptídeo e cobre-peptídeo formados são estáveis à ação enzimática e ao meio ácido do sistema gástrico.

Os estudos *in vivo* evidenciaram que apesar do complexo ferro-peptídeo ser altamente estável às condições gástricas, chegando intacto para absorção no duodeno, o sistema não foi capaz de passar pela membrana dos enterócitos, sendo totalmente eliminado pelas fezes.

Este estudo foi bastante promissor uma vez que foi possível identificar que o feijão endurecido (resíduo da agroindústria) é passível de compostos bioativos, sendo possível utilizá-lo para fabricação de farinhas e enriquecer alimentos nutracêuticos. Além do mais, este estudo cria possibilidades de novas pesquisas relacionadas à absorção do quelato, uma vez que, é possível diminuir o tamanho molecular do complexo, favorecendo a sua absorção no organismo.

8. REFERÊNCIAS

1. Mojica L, Mejía EG. Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods Hum Nutr.* 2015.
2. Montoya CA, Lallès JP, Beebe S, Leterme P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans. *Food Research International.* 2010;43:443–9.
3. Silva OF, Wander AE. Feijão-Comum no Brasil- Passado, Presente e Futuro. In: Feijão EAe, editor. Santo Antônio de Goiás2013.
4. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Monitoramento agrícola. Safra 2015/16. In: Conab, editor.2016.
5. Njoroge DM, Kinyanjui PK, Christiaens S, Shpigelman A, Makokha AO, Sila DN, et al. Effect of storage conditions on pectic polysaccharides in common beans (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the hard-to-cook defect. *Food Research International.* 2015;76:105–13.
6. Segura-Campos MR, García-Rodríguez K, Ruiz-Ruiz JC, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. In vitro bioactivity, nutritional and sensory properties of semolina pasta added with hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysate. *Journal of functional foods.* 2014;8:1–8.
7. Siqueira BS. Desenvolvimento dos fenômenos de escurecimento e endurecimento em feijão carioca: aspectos bioquímicos e tecnológicos [Dissertação de mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2013.
8. Batista KA, Prudencio SH, Fernandes KF. Changes in the biochemical and functional properties of the extruded hard-to-cook cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *International Journal of Food Science and Technology.* 2010;45:794-9.
9. Ruiz-Ruiz J, Martí'nez-Ayala A, Drago S, González R, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. Extrusion of a hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and quality protein maize (*Zea mays* L.) flour blend. *Food Science and Technology.* 2008;41:1799-807.

10. Rehman Z, Shah WH. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*. 2005;91:327–31.
11. Luna-Vital DA, Mojica L, Mejía EG, Mendoza S, Loarca-Piña G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*. 2014.
12. Kumar P, Aradhyam GK. Easy and efficient protocol for purification of recombinant peptides. *Protein Expr Purif*. 2014 Mar;95:129-35.
13. Guo L, Harnedy PA, Li B, Hou H, Zhang Z, Zhao X, et al. Food protein derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;37:92-105.
14. Souza AR, Martins LP, Faria LC, Martins MEP, Fereira RN, Silva AM, et al. Studies on the Bioavailability of Zinc in Rats Supplemented with Two Different Zinc-Methionine Compounds. *Lat Am J Pharm*. 2007;26(6):825-30.
15. Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim Nova*. 2007;2(30):441-9.
16. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr*. 2003 Sep;78(3 Suppl):570S-8S.
17. Carrasco-Castilla J, Hernández-Álvarez AJ, Jiménez-Martínez C, Jacinto-Hernández C, Alaiz M, Girón-Calle J, et al. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chemistry*. 2012;131:1157-64.
18. Graham PH, Ranalli P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*. 1997;53:131-47.
19. Schoonhoven AV, Voysest O. Common beans: research for crop improvement. *Cali Centro Internacional de Agricultura Tropical*. 1991:980.
20. Carvalho WP. Avaliação de linhagens de feijoeiro comum nos anos de 2005 e 2006, nas condições de Cerrado do distrito Federal. In: Cerrados E, editor. Brasília: Boletim de pesquisa e desenvolvimento; 2007.

21. Perspectivas para a agropecuária. In: conab, editor. Brasília 2014. p. 1-155.
22. Yokoyama LP, Peloso MJD, Stefano JGD, Yokoyama M. Nível de aceitabilidade da cultivar de feijão “Pérola”: Avaliação preliminar. In: Feijão EAe, editor. Santo Antônio de Goiás 1999. p. 20.
23. Shiga TM. Participação dos polissacarídeos de parede celular no fenômeno de endurecimento de feijões (*Phaseolus Vulgaris* L.)- cv Carioca-Pérola [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.
24. Lima RAZ. Armazenamento de feijão: uso da embalagem a vácuo na manutenção da qualidade. [Tese de doutorado]. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.
25. Garcia E, Filisetti TMCC, Udaeta JEM, Lajolo FM. Hard-To-Cook Beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of Phenolic Compounds and Pectates. *J Agric Food Ch.* 1998;46:2110-6.
26. Hohlberg AI, Stanley DW. Hard-to-Cook Defect in Black Beans. Protein and Starch Considerations. *J Agric Food Chem.* 1987;35:571-6.
27. Brigide P. Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados [Dissertação de mestrado]. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2002.
28. Batista KA. Aplicações biotecnológicas de feijões endurecidos. universidade Federal de Goiás goiania 2014.
29. Kessel A, Bem-Tal N. Introduction to proteins. Structure, function, and motion. Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group ed. London, 2011.
30. Yu-Hui T. Effect of the hard to cook defect and processing on protein and starch digestibility of cowpeas. *Journal of the Cereal Chemistry.* 1991;68:413–8.
31. Vijayakumari K, Siddhuraju P, Janardhanan K. Effect of soaking, cooking and autoclaving on phytic acid and oligosaccharide contents of the tribal pulse, *Mucuna monosperma* DC. ex. Wight. *Food Chemistry.* 1996;55(2):173-7.

32. Guerrero-Beltrán JA, Estrada-Girón Y, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV. Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. *Food Chemistry*. 2009;116:676–9.
33. Yasmin A, Zeb A, Khalil AW, Paracha GMD, Khattak AB. Effect of Processing on Anti-nutritional Factors of Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*) Grains. *Food Bioprocess Technol*. 2008;1:415–9.
34. Jobstl E, Howse JR, Fairclough JP, Williamson MP. Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *J Agric Food Chem*. 2006 Jun 14;54(12):4077-81.
35. Carbonaro M, Grant G, Cappelloni M, Puztai A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;3(48):742-9.
36. De Freitas V, Carvalho E, Mateus N. Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*. 2003;4(81):503-9.
37. Leal SC. Purificação Preparativa de Inibidores Bowman-Birk, Quantificação em Alimentos e Características Imunogênicas dos Inibidores da *Glycine max* e da *Macrotyloma axillare*. [Dissertação de mestrado]. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2010.
38. Le Berre-Anton V, Bompard-Gilles C, Payan F, Rouge P. Characterization and functional properties of the alpha-amylase inhibitor (alpha-AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Nov 14;1343(1):31-40.
39. Mizubuti IY, Ida EI. constituintes antinutricionais e seus efeitos indesejáveis na alimentação. Londrina 1999. p. 107-12.
40. Silva MR, Silva MAAP. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Rev Nutr*. 2000;13(1):3-9.
41. Huber K. Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e seus efeitos na digestibilidade protéica [Dissertação de mestrado]. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2012.

42. Marquezi M. Características físico-químicas e avaliação das propriedades tecnológicas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) [Dissertação de mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
43. Del Pino VH, Lajolo FM. Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. *Ciênc Tecnol Aliment*,. 2003;23(1):49-53.
44. Jacinto KA. Efeito do consumo de farinha de linhaça (*linum usitatissimum*) no crescimento de ratos wistar e sua relação com a digestibilidade de globulinas e fatores antinutricionais protéicos nas albuminas [Dissertação de mestrado]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.
45. Luna-Vital DA, Mejía EG, Mendoza S, Loarca-Piña G. Peptides present in the non-digestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inhibit the angiotensin-I converting enzyme by interacting with its catalytic cavity independent of their antioxidant capacity. *Journal Royal Society of Chemistry*. 2015;6:1470–9.
46. NELSON DL, COX M. Lehninger – Princípios de Bioquímica. Sarvier ed. São Paulo, 2014.
47. Lemes AC, Sala L, Ores JC, Braga ARC, Egea MB, Fernandes K. A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein RichWaste. *Int J Mol Sci*. 2016;17:950.
48. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 2005;6:945–60.
49. Recio I, Visser S. Two ion-exchange methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin—in situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography*. 1999;831:191–201.
50. Recio I, Floris R, Visser S. Bioactive peptides from food proteins: A new isolation method. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*. 2000;2:9–11.
51. Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim Nova*. 2009;32(3):689-702.

52. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 2010 Oct;31(10):1949-56.
53. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008 May;48(5):430-41.
54. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Apr;18(2):163-9.
55. Chen HM, Muramoto K, F Y. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -Conglycinin. *J Agric Food Chem*. 1995;43:574-8.
56. Sá HJO. Agentes quelantes com utilização terapêutica [Dissertação de mestrado.]. Porto- Portugal: Universidade Fernando Pessoa; 2013.
57. Kratzer FH, Vohra P. Chelates in Nutrition. Boca Raton ed. Florida 1986.
58. Franzan R. Preparação e caracterização físico-química de complexos hidrolisados parciais de proteína com minerais [dissertação de mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP: USP; 2006.
59. Soetan KO, Olaiya CO, Oyewole OE. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*. 2010;4(5):200-22.
60. Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chem*. 2012 Oct 01;134(3):1585-8.
61. Brewer GJ. Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. *Chem Res Toxicol*. 2010 Feb 15;23(2):319-26.
62. Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Oct;289(4):G631-5.
63. Eckert E, Lu L, Unsworth LD, Chen L, Xie J, Xu R. Biophysical and in vitro absorption studies of iron chelating peptide from barley proteins. *Journal of Functional Foods*. 2016;25:291-301.

64. Campos NA. O excesso e a deficiência dietética de ferro em ratos senis aumentam o estresse oxidativo. [Dissertação de mestrado]: Universidade de Brasília; 2011.
65. Sampaio AFS. Efeitos da suplementação com ferro injetável sobre por granulócitos e danos oxidativos em tecidos cardíacos e pancreáticos de rato diabéticos [Dissertação de mestrado]. Ouro Preto Universidade Federal de Ouro Preto; 2012.
66. Crichton RR, Wilmet S, Leggsyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem.* 2002 Jul 25;91(1):9-18.
67. Santos EF. Efeitos da suplementação de galactooligossacarídeo e polidextrose sobre a absorção de cálcio e ferro em ratos gastrectomizados [Dissertação de mestrado]. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas; 2007.
68. Mackenzie B, Garrick MD. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:981–6.
69. Barrios MF, Gómes HGD, Delgado NF. Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2000;3:149-60.
70. Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hcpidin and regulation of body iron metabolismo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:199–203.
71. Oseguera-Toledo ME, Mejia EG, Dia VP, Amaya-Llano SL. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. *Food chemistry.* 2011;127(3):1175-85.
72. De La Fuente M, Borrajo A, Bermudez J, Lores M, Alonso J, Lopez M, et al. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J Proteomics.* 2011 Feb 01;74(2):262-7.
73. Perspectivas para a Agropecuária. conab- companhia nacional de abastecimento Brasília2017. p. 1-112.

74. Lima RAZ. armazenamento de feijão: uso da embalagem a vácuo na manutenção da qualidade [tese de doutorado]: Universidade Federal de Lavras 2013.
75. Siqueira; BdS, Vianello; RP, Fernandes; KF, Bassinello. PZ. Hardness of carioca beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by cooking methods. *LWT - Food Science and Technology*. 2013;54:13-7.
76. Durak AB, B; Anna Jakubczyk, A; Wieca, M. S. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry*. 2013;141:2177–83.
77. Wani IA, Sogi DS, Shivhare US, Gill BS. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Research International* 2015;76:11-8.
78. Ribeiro HJS, Prudêncio SH, Miyagui DT, Ribeiro EL. Caracterização de concentrado protéico de feijão comum preto, cultivar lapar 44 novo e envelhecido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2009;29(3):571-80.
79. Mahatmanto T, Poth AG, Mylne JS, Craik DJ. A comparative study of extraction methods reveals preferred solvents for cystine knot peptide isolation from *Momordica cochinchinensis* seeds. *Fitoterapia*. 2014 Jun;95:22-33.
80. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
81. Arnon R. [14] Papain. *Methods in enzymology*. Nova Iorque 1970. p. 226-44.
82. Deshapande SS, Sathe SK, Salunkhe DK, Comforth DP. Effect of dehulling on pyric acid, polyphenols and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of food Science*. 1982;47:1846-50.
83. Nazeer RA, Kumar NS, Jai Ganesh R. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*. 2012 Jun;35(2):261-8.
84. Silva MEC. Avaliação do potencial quelante de ferro de hidrolisados proteicos de soro de leite obtidos com diferentes enzimas [Dissertação de mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2013.

85. Nutrient Requirements of laboratory Animals. Fourth Revised Edition ed1995.
86. Shiga K, Hara H, Okano G, Aoyama Y. Ingestion of water-soluble soybean fiber prevents gastrectomy-induced iron malabsorption, anemia and impairment of voluntary running exercise performance in rats. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(4): 1120-6.
87. Wortmann AC. Quantificação de ferro em tecido hepático através de espectroscopia por absorção atômica: validação do método com fígado bovino e avaliação comparativa entre tecido fresco e tecido conservado em parafina [Dissertação de mestrado]. Rio Grande do sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
88. Rendina G. Experimental methods in modern biochemistry. Ed. Saunders Golden Series ed. Philadelphia1971.
89. Carlton Jr DD, schug KA. A review on the interrogation of peptide–metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2011;1-2(686):19-39.
90. Mello MO, Tanaka AS, Silva-Filho MC. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. *Mol Phylogenet Evol*. 2003 Apr;27(1):103-12.
91. El Fiel HEA, Eitinay HA, Elsheikh EAE. Effect of nutritional status of faba bean (*Vicia faba*, L) on protein solubility profiles. *Food chemistry*. 2002;76:219-23.
92. Sathe SK, Venkatachalam M. Fractionation and biochemical characterization of moth bean (*Vigna aconitifolia* L) proteins. *LWT*. 2007;40:600-10.
93. Alfenas AC. eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. UFGV Viçosa, 1998.
94. Megias C, Pedroche J, Yust MM, Giron-Calle J, Alaiz M, Millan F, et al. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *J Agric Food Chem*. 2007 May 16;55(10):3949-54.

95. Zhang J, Zhang H, Wang L, Xiaona Guo X, Wang X, Yao H. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *European Food Research and Technology*. 2009;229(4):709-19.
96. Carrasco-Castilla J, Hernandez-Alvarez AJ, Jimenez-Martinez C, Jacinto-Hernandez C, Alaiz M, Giron-Calle J, et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem*. 2012 Dec 01;135(3):1789-95.
97. Lee S, Song KB. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochemistry*. 2009;44:378–38.
98. Ashemead HDW, inventor Iron (III) Amino Acid Chelates With Reducing agents Attached Thereto. 2007.
99. Ueda EK, Gout PW, Morganti L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *J Chromatogr A*. 2003 Feb 21;988(1):1-23.
100. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005 Mar 23;53(6):1841-56.
101. Shimelis EA, Rakshit SK. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Food Chemistry*. 2007;103:161–72.
102. Iguti AM. Caracterização e Síntese dos inibidores de amilase do feijão (*Phaseolus vulgaris*). [Tese de doutorado]. Sao Paulo Universidade de São Paulo; 1993.
103. Alonso RA, A; Marzo, F. . Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. . *food chemistry* 2000;68:159-65.
104. Batista KA, Prudencio SH, Fernandes KF. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J Food Sci*. 2010 Apr;75(3):C286-90.
105. Valle JM, Cottrell TJ, Jackman RL, Stanley DW. Hard-To-Cook defect in black beans: The contribution of proteins to salt soaking effects. *Food Research International*. 1992; 25:429-36.

106. Hoffbrand AV, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. Ed. Artmed ed. Porto Alegre 2013.
107. Aires MdM. Fisiologia. Editora Guanabara Koogan S.A. ed. Rio de Janeiro, 2008.
108. Carvalho CW. Determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina com chumbo em solução aquosa. [Tese de doutorado]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria; 2011.
109. Andersen O. Chemical and biological considerations in the treatment of metal intoxications by chelating agents. . mini-reviews in medicinal chemistry. 2004;4:11-21.
110. Pérez LJM, Tobón G. Compuestos de hierro para suplementación oral: principios y avances. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2006;13(1).
111. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. Annu Rev Nutr. 2006;26:323-42.
112. Bao W, Rong Y, Rong S, Liu L. Dietary iron intake, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2012 Oct 10;10:119.
113. Boccio J, Sallgueiro J, Lysionek A, Zubillaga M, Goldman C, Weill R, et al. Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre um micronutriente esencial. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2003;53(2):119-32.
114. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. Journal of Clinical Nutrition. 2010;91(5):1461-7.
115. Galaris D, Mantzaris M, Amorgianiotis C. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. Hormones (Athens). 2008 Apr-Jun;7(2):114-22.
116. Ashmead HDW. Comparative Intestinal Absorption and Subsequent Metabolism of Metal Amino Acid Chelates and Inorganic Metal Salts. Symposium Series. Washington: American Chemical Society; 1991.

117. Grotto HZW. Iron physiology and metabolism. Rev Bras Hematol Hemoter. 2010;32:8-17.