



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO EM QUÍMICA**

RONALDO CUNHA COELHO

**BIOACCESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE MINERAIS (Cu, Fe, Mg, Mn e
Zn) EM FEIJÃO COMERCIAL E FEIJÃO-CAUPI (BIOFORTIFICADO E NÃO
BIOFORTIFICADO) CRU E COZIDO**

Orientador

Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa

Coorientador

Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior

**Teresina
2022**

RONALDO CUNHA COELHO

BIOACCESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE MINERAIS (Cu, Fe, Mg, Mn e Zn) EM FEIJÃO COMERCIAL E FEIJÃO-CAUPI (BIOFORTIFICADO E NÃO BIOFORTIFICADO) CRU E COZIDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, na área de Química analítica, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior

**Teresina
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Sistema de Bibliotecas da UFPI – SIBi/UFPI
Biblioteca Setorial do CCN

C672b Coelho, Ronaldo Cunha.
Bioacessibilidade e biodisponibilidade de minerais (Cu, Fe, Mg, Mn e Zn) em feijão comercial e feijão-caupi (biofortificado e não-biofortificado) cru e cozido / Ronaldo Cunha Coelho. – 2022.
123 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, Teresina, 2022.
“Orientador: Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa”.
Coorientador: Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior.

1. Feijões. 2. Nutrientes Minerais. 3. Biofortificação. 4. Desnutrição. I. Barbosa, Herbert de Sousa. II. Título.

CDD 572.515

Bibliotecária: Caryne Maria da Silva Gomes. CRB/3-1461

RONALDO CUNHA COELHO

Bioacessibilidade e biodisponibilidade de minerais (Cu, Fe, Mg, Mn e Zn) em feijão comercial e feijão-caupi (biofortificado e não biofortificado) cru e cozido

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica

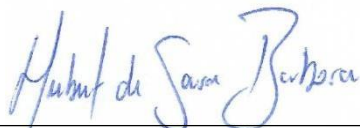
Linha de Pesquisa: Bioanalítica

Orientador: Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior


Aprovado em 07 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa
(UFPI)
Orientador

Documento assinado digitalmente

 Edivan Carvalho Vieira
Data: 28/07/2022 09:03:39-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira
(UFPI)

Examinador Interno ao Programa



Prof. Dra. Heloisa França Maltez
(UFABC)
Examinadora Externa ao Programa




Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior
(UFPI)
Coorientador

Documento assinado digitalmente

 REGILDA SARAIVA DOS REIS MOREIRA ARAUJO
Data: 27/07/2022 16:10:33-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz
(UFPI)

Examinador Interno ao Programa

 REGILDA SARAIVA DOS REIS MOREIRA ARAUJO
Data: 27/07/2022 16:10:33-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Regilda Saraiva dos Reis
Moreira Araújo
(UFPI)

Examinador Externo ao Programa

*Dedico essa conquista à Deus e a minha mãe,
Luzia Alves Cunha, pela dedicação no cuidar
da minha saúde e com isso oportunizar esse
momento de vitória.*

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiro a Deus por tudo que consegui em minha vida;

Aos meus avós, Policarpo Machado (in memoriam) e Iraci Coelho, Francisco Pereira da Costa e Maria da Cunha, por ensinar com suas vidas simples que eu tinha uma oportunidade única;

Agradeço ao meu pai, Reginaldo Coelho, e minha mãe, Luzia Alves Cunha, por tudo que fizeram por mim até hoje;

Aos meus irmãos, Romualdo Coelho e Raylene Coelho, que trilharam comigo na busca por conhecimento e com isso conseguir uma vida digna;

À minha esposa, Jéssyka Nara, pela compreensão e paciência demonstrada durante o período do estudo.

Ao meu filho, Benjamin Coêlho, por me dar essa oportunidade única de ser pai e perceber a grandiosa missão que tenho como educador;

Agradeço aos professores Fabiano Macedo, Graziella Moita e Edmilson Moura por terem me ajudado na busca de conhecimentos;

À minha amiga, Izabele Damasceno e família, que me encorajou a fazer o doutorado;

À professora Heloisa Maltez e seu aluno Roberto Barsotti que me ajudaram no período que estive realizando análises em São Paulo;

Ao prof. Edvani Muniz pela oportunidade de ministrar meu primeiro minicurso para alunos de pós-graduação e ainda pela melhor disciplina que paguei no curso;

Ao prof. Luiz Fernando e aos demais docentes do curso de lic. em Química do campus teresina central que permitiram o meu afastamento para me dedicar mais as atividades acadêmicas;

Agradeço a meu amigo Darlisson Slag e demais colegas que fazem o grupo GRIAPA e GEBIO pela paciência e ajuda;

Também agradeço ao meu amigo Luiz Brito e demais que fizeram o grupo de “estudo na salinha” e motivaram a todos a continuar nosso trabalho nesse período pandêmico;

Agradeço as alunas Maria das Dores e Patrícia Alves e os técnicos Luan Pinto, Jurandy Silva e Poliana Sousa pelas aulas no laboratório;

Agradeço à Josélia que auxiliava na limpeza do laboratório e da salinha de estudo, a todos que fazem a lanchonete do Assis e ainda a todos que fazem a coordenação de pós-graduação em Química da UFPI;

Por fim agradeço ao meu orientador e coorientador, Herbert Barbosa e Cicero Alves, que aceitaram a missão de me guiar ao longo da execução deste trabalho.

Obrigado a todos...essa vitória é nossa

*Pensando bem! fiz muitas escolhas ruins,
porém também fiz escolhas boas. Entretanto
cada escolha aprendi uma lição! (Salomão)*

Súmula curricular

1. Dados Pessoais

Ronaldo Cunha Coêlho

Brasileiro, natural de Teresina, PI

Professor do Instituto Fed. de Ed., Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Teresina Central

E-mail: ronald@ifpi.edu.br

2. Formação Acadêmica

2017-2022 Doutorado em Química na Universidade Federal do Piauí

2008-2011 Mestrado em Química na Universidade Federal do Piauí

2008-2009 Licenciatura em Química na Universidade Federal do Piauí

2003-2007 Bacharelado em Química na Universidade Federal do Piauí

3. Produção científica com docentes e discentes do programa

Artigos completos publicados em periódicos: 4

Artigos submetidos e em processo de revisão: 2

Artigo em fase de escrita para submissão em 2022: 2

Trabalhos apresentados em congressos internacionais: 1

Trabalhos apresentados em congressos nacionais: 1

Participações em eventos: 2

3.1. Descrição dos artigos completos publicados como autor principal ou com coautoria com alunos do programa

COELHO, R. C. *et al.* Expanding information on the bioaccessibility and bioavailability of iron and zinc in biofortified cowpea seeds. **Food Chemistry**, v. 347, n. Jan, p. 129027, 2021.

SOUSA, F., L. B. *et al.* Optimization of Pectin Extraction using Response Surface Methodology: a bibliometric analysis. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100229>, June (on line), 2022.

BARROS, E. D. S. *et al.* Comparative study of composition of methanolic extracts of the paratoid gland secretions (PGS) of *Rhinella jimi* (cururu toad) from northeastern Brazil: Gender, seasonality and geographic occurrence. **Toxicon**, v. 214, p. 37–4., 2022

SILVA, D. S. N. *et al.* Espectroscopia Raman e Infravermelho próximo para identificação de carotenoides em amostras vegetais: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 2, feb, p. 14285-14302, 2021.

RESUMO

Este trabalho apresenta novas descobertas sobre a qualidade nutricional de cultivares de feijão-caupi biofortificadas e não biofortificadas recentemente introduzidas, bem como de alguns feijões comerciais. As cultivares foram analisadas nas formas crua e cozida onde, em ambas, foram medidas as concentrações dos elementos Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. Nas amostras cruas foram medidas ainda a concentração de compostos fenólicos totais e a composição centesimal. A técnica de ICP-MS foi utilizada para as medições das concentrações dos elementos. Cultivares de feijão-caupi biofortificado apresentaram altos níveis de Fe e Zn indicando que são fontes ricas destes micronutrientes. O protocolo de digestão *in vitro* possibilitou a avaliação simultânea dos teores bioacessíveis e biodisponíveis dos elementos estudados. As concentrações de Fe em cultivares de feijão-caupi biofortificada e não biofortificada foram *ca.* 2,5 vezes maior em relação aos feijões comerciais. Para o elemento Zn, as cultivares de feijão-caupi cru apresentaram 50% de bioacessibilidade e 44% de biodisponibilidade. O feijão-caupi cozido biofortificado apresentou elevada biodisponibilidade de Zn, com valores acima de 60%. O consumo de 50 g da cultivar biofortificada Aracê contribuiria com 27% e 48% de Fe e Zn, respectivamente, na ingestão diária recomendada para crianças de 1 a 3 anos. A concentração de manganês nas cultivares biofortificadas foi maior em comparação ao feijão comercial e a bioacessibilidade foi de *ca.* 52% superior. Além disso, a concentração de magnésio foi maior, atingindo valores acima de 50% de bioacessibilidade e 21% de biodisponibilidade. O cozimento melhorou a disponibilidade de minerais nas cultivares biofortificadas. Além disso, as cultivares de feijão-caupi avaliadas apresentaram elevada concentração de lipídios e valores energéticos. Os compostos fenólicos nos grãos são consideravelmente polares. Avaliando as interações, encontraram-se correlações sinérgicas desconhecidas entre cobre e magnésio e entre manganês e o percentual lipídico. A correlação antagônica de cobre e manganês com zinco explicam sua concentração limitada no feijão-caupi biofortificado. A análise de PCA discriminou as cultivares de feijão-caupi e feijão comercial, indicando a prevalência dos efeitos da biofortificação. As novas cultivares biofortificadas de feijão-caupi possuem concentração de nutrientes compatíveis com as demandas da dieta humana, representando uma fonte potencial para melhorar o status de Fe, Zn e Mn em grupos onde a deficiência de micronutrientes é prevalente.

Palavras-chave: Feijões; Biofortificação; bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes; digestão *in vitro*; Desnutrição; ICP-MS; análise multivariada.

ABSTRACT

This work presents new findings on the nutritional quality of recently introduced biofortified and non-biofortified cowpea cultivars, as well as some commercial beans. The cultivars were analyzed in raw and cooked forms, where, in both, the concentrations of the elements Fe, Zn, Cu, Mn and Mg were measured. In the raw samples, the concentration of total phenolic compounds and the percentage composition were also measured. The ICP-MS technique was used to measure the concentrations of the elements. Biofortified cowpea cultivars showed high levels of Fe and Zn, indicating that they are rich sources of these micronutrients. The *in vitro* digestion protocol allowed the simultaneous evaluation of the bioaccessible and bioavailable contents of the studied elements. Fe levels in biofortified and non-biofortified cowpea cultivars were *ca.* 2.5 times higher compared to commercial beans. For the element Zn, the cowpea cultivars of raw presented 50% of bioaccessibility and 44% of bioavailability. The biofortified cooked cowpea showed high Zn bioavailability, with values above 60%. The consumption of 50 g of the biofortified cultivar Aracê would contribute with 27% and 48% of Fe and Zn, respectively, in the recommended daily intake for children aged 1 to 3 years. The concentration of manganese in the biofortified cultivars was higher compared to the commercial bean and the bioaccessibility was *ca.* 52% higher. In addition, the concentration of magnesium was higher, reaching values above 50% of bioaccessibility and 21% of bioavailability. Cooking improved the availability of minerals in the biofortified cultivars. In addition, the evaluated cowpea cultivars showed high concentration of lipids and energy values. The phenolic compounds in the beans are highly polar. Evaluating the interactions, unknown synergistic correlations were found between copper and magnesium and between manganese and lipid percentage. The antagonistic correlation of copper and manganese with zinc explains their limited concentration in biofortified cowpea. PCA analysis discriminated between cowpea and commercial bean cultivars, indicating the prevalence of biofortification effects. The new biofortified cowpea cultivars have a concentration nutrients compatible with the demands of the human diet, representing a potential source to improve the status of Fe, Zn and Mn in groups where micronutrient deficiency is prevalent.

Keywords: Beans; Biofortification; nutrient bioavailability; *in vitro* digestion; malnutrition; ICP-MS; multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Concentração total (mg kg^{-1}) de ferro em feijão comercial, em sementes cruas de cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.....49
- Figura 2:** Concentração total (mg kg^{-1}) de zinco em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.....50
- Figura 3:** Concentração de ferro bioacessível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no topo das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.....52
- Figura 4:** Concentração de ferro biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes. .53
- Figura 5:** Concentração de zinco bioacessível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cruas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.54
- Figura 6:** Concentração de zinco biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cruas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.55
- Figura 7:** Concentração total (mg kg^{-1}) e fator de retenção de ferro em sementes cozidas de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.....56
- Figura 8:** Concentração total (mg kg^{-1}) e fator de retenção de zinco em sementes cozidas de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.....58
- Figura 9:** Concentração de ferro bioacessível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes. .59

Figura 10: Concentração de ferro biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes. .60	60
Figura 11: Concentração de zinco bioacessível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. A mesma letra minúscula no topo das colunas representa médias estatisticamente semelhantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).62	62
Figura 12: Concentração de zinco biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão-comercial, cultivares de feijão-caupi, biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.63	63
Figura 13: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) total de cobre e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).77	77
Figura 14: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) bioacessível de cobre e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ..78	78
Figura 15: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) biodisponível de cobre e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ..79	79
Figura 16: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) total de manganês em sementes de cultivares crua de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 81	81
Figura 17: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) bioacessível e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ..82	82
Figura 18: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) biodisponível e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra	

minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)... 84	
Figura 19: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) total em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 85	
Figura 20: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) bioacessível de magnésio e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)... 86	
Figura 21: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) biodisponível de magnésio e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 87	
Figura 22: Concentração total (mg kg^{-1}) de cobre fator de retenção (%) em sementes cozida de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada..... 89	
Figura 23: Concentração total (mg kg^{-1}) de manganês e fator de retenção (%) em sementes cozida de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada 90	
Figura 24: Concentração total (mg kg^{-1}) de magnésio e fator de retenção (%) em sementes cozida de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada 91	
Figura 25: Valores encontrados (média \pm desvio padrão, $n=3$) para a concentração* fenóis totais, em mg g^{-1} , em sementes cruas de cultivares de feijão-caupi e feijão comercial. 100	
Figura 26: Gráfico de PC1 vs PC2 com escores (eixo preto) e loadings (eixo azul) considerando os fatores nutricionais avaliados nas sementes cultivares de feijão cruas e cozidas. As letras A, D e T referem-se às concentrações bioacessíveis e biodisponíveis e ao total de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg nas amostras, em sua na forma crua (r) e cozida (c)..... 105	
Figura 27: Gráfico de PC3 vs PC4 com escores e loadings considerando os fatores nutricionais avaliados nas sementes cultivares de feijão cruas e cozidas. As letras A, D e T referem-se às concentrações bioacessíveis e biodisponíveis e ao total de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg na amostras, em sua forma crua (r) e cozida (c)..... 108	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições operacionais do ICP-MS para determinação quantitativa dos metais. ...	47
Tabela 2: Determinação das concentrações dos metais presentes no material certificado (desvio padrão dos valores médios, n=3) por ICP-MS com adição de padrão interno	48
Tabela 3: Porcentagem de contribuição do consumo de 50 g de cultivares de feijão cozido para ingestão diária de Fe e Zn por gestantes e crianças de 1 a 3 anos.	65
Tabela 4: Valores dos coeficientes de Pearson para a correlação entre a concentração total (T), bioacessível (A) e biodisponível (D) de ferro e zinco em sementes de diferentes cultivares de feijão.	66
Tabela 5: Concentração (mg kg^{-1} , n=3) bioacessível e frações (%) de cobre, manganês e magnésio em sementes cozidas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não biofortificada.....	92
Tabela 6: Concentração (mg kg^{-1} , n=3) biodisponível e frações (%) de cobre, manganês e magnésio em sementes cozidas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada.	94
Tabela 7: Concentrações obtidas (média \pm desvio padrão, n=3) para a composição centesimal e o valor energético em sementes cruas de cultivares de feijão-caupi e feijão comercial*.....	97
Tabela 8: Valores dos coeficientes de Pearson para as correlações entre a composição centesimal, CFT, a concentração total (T) de Cu, Mn, Mg, Fe e Zn e as suas frações bioacessíveis (A%) e biodisponíveis (D%).	103
Tabela 9: Loadings dos fatores nutricionais avaliados para os quatro componentes principais.	107

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Classificação do feijão com base nas classes.	21
QUADRO 2: Classificação dos feijões (Grupo I e Grupo II) de acordo com a tolerância de defeitos expressos em % de massa.	21
QUADRO 3: Quantidade, em µg, recomendada para a ingestão de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg.....	33

LISTA DE ACRÔNIMOS

Ac	Concentração bioacessível na semente cozida
AI	Ingestão Adequada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	Concentração bioacessível na semente crua
ARA	Feijão-caupi Aracê
BRA	Feijão comercial Branco
BRS	Materiais provenientes do programa de melhoramento genético liderado pela Embrapa
CAR	Feijão comercial Carioca
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COVID-19	Doença do Coronavírus
Dc	Concentração total na semente cozida
Dr	Concentração total na semente crua
DRI	Ingestão Dietética de Referência
ETAAS	Espectroscopia de Absorção Atômica de Forno de Grafite
FAAS	Espectroscopia de Absorção Atômica com Chama
GUA	Feijão-caupi Guariba
IDR	Ingestão Diária Recomendada
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
ICPOES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Componentes principais
PRE	Feijão comercial Preto
RDA	Ingestão Dietética Recomendada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Tc	Concentração total na semente cozida
Tr	Concentração total na semente crua
TUM	Feijão-caupi Tumucumaque
UL	Nível de ingestão superior tolerável
VER	Feijão comercial Verde
XIQ	Feijão-caupi Xiquexique

SUMÁRIO

1	Introdução	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Leguminosas	20
2.2	Feijão	20
2.2.1	Feijão comum: Grupo I.....	22
2.2.2	Feijão caupi: Grupo II.....	22
2.3	Feijão: produção atual.....	23
2.4	Melhoramento genético de plantas	24
2.5	Melhoramento genético do feijão-caupi.....	26
2.6	Cultivares BRS Aracê, BRS Xiquexique, BRS Tumucumaque e BRS Guariba.....	28
2.7	Microminerais	29
2.7.1	Cu e Mn	30
2.7.2	Zn e Fe	31
2.7.3	Limites diários recomendados de Cu, Fe, Mg, Mn e Zn	32
2.8	Bioacessibilidade e biodisponibilidade	34
2.9	Compostos fenólicos	36
2.10	Processamento do alimento	37
2.11	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	38
	CAPÍTULO 1: Bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro e zinco em sementes de feijão comercial e feijão-caupi (biofortificado e não biofortificado).....	41
3.	OBJETIVOS	42
3.1	Geral.....	42
3.2	Específico	42
4	PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1	Reagentes, padrões e materiais	43
4.2	Amostras de feijão.....	43

4.3	Preparo das amostras	44
4.4	Determinação da concentração total de Fe e Zn em sementes de feijão cru e cozida	44
4.5	Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> de sementes de feijão	45
4.6	Fator de retenção (%)	46
4.7	Instrumentação.....	46
4.8	Análise estatística	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Exatidão e detectabilidade do método de quantificação.....	48
5.2	Concentração total de micronutrientes Fe e Zn em cultivares de feijão-caupi	49
5.3	Bioacessibilidade e biodisponibilidade de Fe em sementes de feijão	51
5.4	Bioacessibilidade e biodisponibilidade de Zn em sementes de feijão	54
5.5	Efeito do cozimento na concentração total de ferro e zinco em feijão	56
5.6	Efeito do cozimento na concentração bioacessível e biodisponível de ferro em feijão	58
5.7	Efeito do cozimento na concentração bioacessível e biodisponível de zinco em feijão	61
5.8	Predição da contribuição do consumo de feijão-caupi na ingestão diária de Fe e Zn	64
5.9	Avaliação da interação Fe-Zn	66
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
CAPÍTULO 2: Efeito da biofortificação na composição nutricional e compostos fenólicos presentes em feijão comercial e feijão-caupi (biofortificado e não biofortificado).....		69
7	OBJETIVOS	70
7.1	Geral.....	70
7.2	Específico	70
8	PARTE EXPERIMENTAL	71
8.1	Reagentes, padrões e materiais	71

8.2	Determinação da concentração total, bioacessível e biodisponível Cu, Mn e Mg	71
8.3	Concentração de compostos fenólicos	71
8.4	Composição centesimal.....	72
8.4.1	Umidade.....	72
8.4.2	Cinzas.....	73
8.4.3	Lipídios totais	73
8.4.4	Proteínas totais.....	74
8.4.5	Carboidratos totais	75
8.4.6	Valor energético total.....	75
8.5	Análise estatística	75
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
9.1	Controle de qualidade das determinações dos elementos.....	76
9.2	Concentração total, bioacessível e biodisponível dos nutrientes minerais nos feijões crus	76
9.2.1	Cobre.....	76
9.2.2	Manganês	80
9.2.3	Magnésio.....	84
9.3	Concentração total, bioacessível e biodisponível dos nutrientes minerais nos feijões cozidos	88
9.4	Composição centesimal e valor energético nos feijões crus.....	97
9.5	Concentração de compostos fenólicos totais (CFT) nos feijões crus	99
9.6	Correlação e análise de componentes principais.....	102
10.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
11	CONCLUSÃO.....	111
	REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

A deficiência mineral de Fe e Zn afeta mais da metade da população mundial e é um sério problema de saúde pública para a humanidade (KHATIBZADEH *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016). Por outro lado, outros elementos, como Cu, Mg e Mn, possuem funções vitais para a planta e são essenciais para a dieta humana (ANASTASSOPOULOU; THEOPHANIDES, 2002; COBINE; MOORE; LEARY, 2021; SOARES *et al.*, 2020).

O feijão é atualmente considerado uma das leguminosas mais importantes em todo o mundo (HOPPLER *et al.*, 2014). Sua matriz nutricional é composta principalmente por proteínas, carboidratos, fibras alimentares (solúveis e insolúveis), minerais, compostos fenólicos e vitaminas (CARBAS *et al.*, 2020). O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Wap.) apresenta grande variabilidade genética e potencial para aumentar a biodisponibilidade de Fe e Zn em suas sementes (CARVALHO *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2017; FEITOSA *et al.*, 2018).

A biofortificação é um das muitas estratégias que podem ser utilizadas para reduzir as deficiências nutricionais na população (BOUIS *et al.*, 2011). Ela é baseada no melhoramento genético de plantas para potencializar a qualidade nutricional dos alimentos, aumentando a concentração e a disponibilidade de nutrientes (SINGH *et al.*, 2016). Considerando esses fatores, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) incorporou o feijão-caupi ao seu programa de melhoramento genético e recentemente produziu as cultivares Aracê, Tumucumaque e Xiquexique biofortificadas, visando ao aumento das concentrações de Fe e Zn.

O aumento na concentração total de micronutrientes em uma cultura básica não assegura um efeito benéfico para o ser humano devido à presença de inibidores de nutrientes na matriz alimentar vegetal. FEITOSA *et al.*, (2018), informam que as interações dos micronutrientes com outros micronutrientes, fibras, lipídios, proteínas, fitatos e polifenóis durante a digestão podem influenciar nesse processo de absorção.

Nesse sentido, no capítulo 1 do trabalho, são discutidas as análises das concentrações totais, bioacessíveis e biodisponíveis de Fe e Zn em oito amostras de feijão, nas formas crua e cozida, sendo três feijões caupi biofortificado, um feijão-caupi não biofortificado e quatro feijões comerciais, Branco, Carioca, Preto e Verde, adquiridas no comércio local da cidade de Teresina-PI. No capítulo 2, com os mesmos feijões estudados no capítulo 1, foram avaliados os efeitos da biofortificação, com o foco na disponibilidade de cobre, manganês e magnésio, na composição centesimal e nos compostos fenólicos totais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leguminosas

Após alguns anos de declínio e estabilidade, os níveis de prevalência de desnutrição aumentaram nos países da África e América Latina, influenciados, principalmente, pela pandemia de COVID-19 (FAO, 2021) e as leguminosas representam um grupo alimentar que desempenham um papel significativo na nutrição humana e podem auxiliar na redução destes problemas nutricionais (PEREIRA *et al.*, 2020b). Isso pois, no mundo, apenas 20 culturas, entre elas cereais, leguminosas e raízes são responsáveis pela maioria das calorias consumidas pela população (MOHANTY; SINGH; CHAPMAN, 2020). Importante do ponto de vista nutricional (proteínas, fibras alimentares, vitaminas e minerais) e socioeconômico, as leguminosas foram destaque e tema da Organização para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization*) em 2016 (SANTOS *et al.*, 2018).

As leguminosas (Fabaceae) podem ser definidas como “vagem ou fruto”, contêm sementes ou grãos secos e a capacidade de fixar nitrogênio no solo (KUMAR; PANDEY, 2020). Com até 750 gêneros e 19.000 espécies, centenas delas importantes espécies de grãos, pastagens e agroflorestais, as leguminosas perdem apenas para as gramíneas (Poaceae) com relação à importância para os seres humanos (MOHANTY; SINGH; CHAPMAN, 2020). As leguminosas podem ser classificadas em grãos e oleaginosas (estas contêm na sua composição maior quantidade de gordura) (CÉLIA CRAVEIRO *et al.*, 2016). São exemplos da classe grãos o grão de bico (*Cicer arietinum L.*), o feijão (*Cajanus cajan L.*, *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata L.*, *Vigna mungo L.*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna aconitifolia*), lentilha (*Lens culinaris Medik*) e, de exemplos da oleaginosa, têm-se a soja (*Glycine max*) e o amendoim (*Arachis hypogaea*) (KUMAR; PANDEY, 2020).

2.2 Feijão

Por definição, segundo a instrução normativa nº 12 de 28 de março de 2008, os feijões são grãos provenientes das espécies *Phaseolus vulgaris L.* e *Vigna unguiculata (L) Walp.* São classificados por grupos, classes e tipos. Os grupos são divididos de acordo com a espécie a que pertence, sendo o feijão comum, espécie *Phaseolus vulgaris L.*, do grupo I e os feijões da espécie *Vigna unguiculata (L) Walp.* pertencentes ao grupo II (BRASIL, 2008). Com relação

às classes, a separação é feita com base nas cores do tegumento (película), e as subdivisões podem ser vistas no Quadro 1 a seguir.

QUADRO 1: Classificação do feijão com base nas classes.

Cor	Grupo I	Grupo II
Branco	≥ 97% de grãos de coloração branca	≥ 90% de grãos de coloração branca
Preto	≥ 97% de grãos de coloração preta	≥ 90% de grãos de coloração preta
Cores	Grãos da mesma coloração, admitindo-se, no máximo, 3% de mistura de outras classes e de 10% de mistura de outras cultivares da classe cores, desde que apresente cores contrastantes ou tamanhos diferentes	≥ 90% de grãos da classe cores, admitindo-se até 10% de mistura de outras cultivares da classe cores, desde que apresente cores contrastantes ou tamanhos diferentes.
Misturado	Produto que não atende às especificações de nenhuma das classes anteriores	

Fonte: Instrução normativa nº 12 de 28 de março de 2008.

Já quanto ao tipo do feijão, a classificação é feita de acordo com os percentuais de tolerância de defeitos (BRASIL, 2008). As subdivisões estão presentes no Quadro 2 a seguir. Quanto ao total de matérias estranhas e impurezas pode existir de 0 a 0,1%, 0,1 a 0,2% e 0,2 a 0,3% nos tipos 1, 2, 3, respectivamente. Existem ainda os tipos nenhum e desclassificado que não constam no Quadro 2.

QUADRO 2: Classificação dos feijões (Grupo I e Grupo II) de acordo com a tolerância de defeitos expressos em % de massa.

Tipo	Defeitos Graves			Defeitos Leves*
	Matérias Estranhas e Impurezas	Mofados, Ardidos e Germinados	Carunchados e Atacados por Lagartas das Vagens	
1	0 a 0,50%	0 até 1,50%	0 a 1,50	0 a 2,50
2	> 0,50% a 1,00%	> 1,50% a 3,00%	> 1,50 a 3,00	> 2,50 a 6,50
3	> 1,00% a 2,00%	> 3,00% a 6,00%	> 3,00 a 6,00	> 6,50% a 16,00

Fonte: Instrução normativa nº 12 de 28 de março de 2008. *Incidência sobre o grão não restringem ou inviabilizem a utilização do produto (grãos amassados, danificados, imaturos, quebrados e partidos).

2.2.1 Feijão comum: Grupo I

O termo "feijão" é aplicado ao feijão comum ou vulgar, da espécie *Phaseolus vulgaris* L. (JÚNIOR, 1960). Revisões do gênero indicam que o número de espécies de feijão pode variar de 31 a 52, sendo que somente cinco são cultivadas (*Phaseolus vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman) (SILVA; COSTA, 2003). Pertencente à família Fabaceae (Leguminosas), subfamília papilionáceas, tribo faseóleas, gênero phaseolus, espécie vulgaris (JÚNIOR, 1960) o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura mundial significativa e fornece uma leguminosa importante em termos de rendimento total e área cultivada (TORMENA *et al.*, 2021).

O feijão comum tem origem no Peru, conhecida como quichua de uruto, foi domesticada e amplamente cultivada durante o grande Império dos Incas e disseminada em outras regiões da América, e indo para a Europa após o descobrimento do continente americano (JÚNIOR, 1960) e em seguida para Ásia e, atualmente, distribuídas em todo o mundo.

2.2.2 Feijão caupi: Grupo II

Dentre as leguminosas, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é um dos alimentos básicos mais importantes para a população do Norte e Nordeste do Brasil, por apresentar alto valor nutricional e excelente fonte de ferro e zinco (MARTINS *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2016). Adaptado às regiões quentes e áridas (MARTINS *et al.*, 2018), o feijão-caupi é uma planta Dicotiledônea, que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção Catyang, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e subespécie *unguiculata* (FREIRE FILHO, 2011). É dividida em quatro cultigrupos: *Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilis*, sendo no Brasil, cultivados os cultigrupos *Unguiculata* para produzir feijão verde e seco e o cultigrupo *Sesquipedalis*, comumente chamado de feijão-de-metro, cultivado para a produção de vagem (FREIRE FILHO, 2011).

O feijão-caupi é uma cultura de origem africana e foi introduzido no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no Estado da Bahia e depois disseminado pelo Nordeste e demais regiões do País. No Piauí existe registro de cultivos desse feijão de 1697. O feijão-caupi possui vários nomes, que variam dependendo do local onde é cultivado. Entre eles, podem-se citar os seguintes: feijão-macassa e feijão-de-corda

(Nordeste), manteiguinha, feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada (Norte), já no Sul é chamado de feijão-miúdo. Nos estados de Sergipe, Bahia e Rio de Janeiro é comum o feijão-fradinho, um tipo de feijão-caupi em que o grão tem o tegumento branco com um grande halo preto, o preferido para o preparo do acarajé, comida típica do Estado da Bahia, conhecido em todo o Brasil (FREIRE FILHO, 2011).

No mundo, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma das leguminosas mais importantes produzidas nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente nos países em desenvolvimento da África, América Latina e Ásia (BARROS *et al.*, 2017; COUTINHO *et al.*, 2014; SOMBIÉ *et al.*, 2018). Por sua robustez, é conhecido por sua adaptabilidade à água, ao calor e ao estresse salino e é amplamente cultivado por pequenos e médios produtores das regiões Nordeste e Norte do Brasil, onde representa uma importante fonte de renda e de empregos (BARROS *et al.*, 2017). O feijão-caupi adapta-se bem às condições de baixa disponibilidade de água. Assim, sua produção concentra-se mais nos estados da região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Mato Grosso e Minas Gerais). Por essa menor exigência de água, em comparação ao feijão-comum cores e preto, a cultura é plantada de forma mais tardia (CONAB, 2022).

2.3 Feijão: produção atual

O consumo de feijão ocorre principalmente em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Tradicional na dieta dos brasileiros, é considerado um excelente alimento, perdendo apenas para o arroz como alimento básico mais consumido no país (MESQUITA *et al.*, 2007). Com relação à produção, a safra brasileira de 2020/21 foi 2876,3 mil de toneladas, estando o Brasil entre os quatro países que mais produzem feijão no mundo, perdendo apenas para China, Índia, Myanmar (ARAGÃO; CONTINI, 2021; CONAB, 2022).

Porém apesar de estar entre os quatro maiores, o Brasil não está entre os 10 maiores exportadores de feijão, mostrando que a produção de feijão é destinada principalmente para o consumo interno (ARAGÃO; CONTINI, 2021). No Brasil, segundo o sexto levantamento da safra brasileira (2021/2022) publicado em março de 2022, o feijão possui uma área plantada de 2930,1 mil hectares e uma produtividade de 1033 kg por hectares. Isso gerará uma produção de 3027 mil toneladas, 5,2% superior ao contabilizado na safra 20/21 (CONAB, 2022). Já com relação ao feijão-caupi, Piauí, Bahia e Tocantins estão entre os maiores

produtores e, considerando o mesmo período citado, a produção é 16% superior (CONAB, 2022).

2.4 Melhoramento genético de plantas

Com a crise provocada pela pandemia da COVID-2019 estima-se que ocorrerá a adição de mais 161 milhões de pessoas aos casos de desnutrição (HARVESTPLUS, 2022). Entre 2004 e 2020, o HarvestPlus e seus parceiros apoiaram a liberação de 262 variedades de 12 cultivos biofortificados em 30 países. Entre pequenos produtores e famílias agrícolas, são mais de 48 milhões de pessoas que estão se beneficiando de culturas biofortificadas criadas convencionalmente.

O melhoramento genético e a biofortificação de feijão com ferro possibilitam o fornecimento de 80% das necessidades diárias desse micronutriente, além de oferecer sementes com alto rendimento, resistentes a pragas, calor e seca (HARVESTPLUS, 2022). Para a HARVESTPLUS, (2022), a concentração alvo total (concentração do micronutriente da linha de base + aumento da biofortificação) do micronutriente ferro é de 94 mg kg⁻¹. Já para a Embrapa (Qualidade de Grãos da Embrapa Arroz e feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás e Bromatologia da Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí.), são consideradas sementes ricas em ferro e zinco aquelas que apresentam concentrações superiores a 60 mg kg⁻¹ e 40 mg kg⁻¹, respectivamente (FREIRE FILHO, 2011).

A América Latina e Caribenha concentra o maior percentual de países com cultivares liberadas com a biofortificação de ferro em feijão, pois, com exceção de México, Peru e Haiti, todos os países possuem cultivares já liberadas. Com relação à biofortificação de ferro e zinco em feijão, apenas Índia e Brasil possuem cultivares já liberadas, e a Nigéria possui cultivares em fase de testes (HARVESTPLUS, 2022).

HarvestPlus é líder global em biofortificação com interesse de entregar alimentos que forneçam dietas sustentáveis e saudáveis para todas as pessoas. Para isso trabalha com a biofortificação de culturas (arroz, trigo, milho, feijão, mandioca, batata-doce e etc) com micronutrientes essenciais, como vitamina A, ferro e/ou zinco (HARVESTPLUS, 2022). A biofortificação é o processo de aumentar a quantidade de nutrientes em culturas alimentares. Isso pode ser feito de três formas diferentes (HARVESTPLUS, 2022):

Melhoramento convencional de plantas: seleciona variedades de espécies que são naturalmente ricas em micronutrientes específicos e realiza o cruzamento com variedades locais. Assim aumenta-se a concentração de nutrientes das plantas sem a utilização de

organismos geneticamente modificados. As culturas biofortificadas liberadas pela HarvestPlus e seus parceiros foram desenvolvidas usando métodos convencionais de melhoramento de plantas.

Biofortificação agronômica: aumenta a quantidade de micronutrientes na parte comestível das plantas através da aplicação de fertilizantes minerais nas folhas, no solo ou na água de irrigação.

Modificação genética: realiza alterações na estrutura do DNA das plantas, sendo, nesse caso, variedades geneticamente modificadas.

A desnutrição proteico-energética e as deficiências minerais são duas das três formas de deficiências nutricionais que afetam a maioria dos países em desenvolvimento devido ao acesso inadequado a alimentos e dietas baseadas em uma única cultura (MEYER *et al.*, 2013). As deficiências de micronutrientes são comuns em crianças e ainda mais comuns em mulheres devido às perdas de sangue ocorridas durante a menstruação e o parto (KUMAR *et al.*, 2019; KUMAR; PANDEY, 2020). Menos da metade da população mundial consome micronutrientes na quantidade diária recomendada (SILVA *et al.*, 2021). A desnutrição de micronutrientes, designada comumente como “fome oculta”, afeta cerca de dois milhões de pessoas no mundo, atingindo, principalmente mulheres, bebês e crianças (OKWUONU *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021).

Para esses grupos de pessoas, mulheres e crianças, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu metas globais para melhorar a nutrição e com isso reduzir o atraso no crescimento de crianças menores de 5 anos e a anemia em mulheres em idade reprodutiva etc. (OMS, 2020). As Nações Unidas também traçaram objetivos para o desenvolvimento sustentável e objetiva acabar com todas as formas de fome e desnutrição até 2030, especialmente em crianças. Para isso, devem-se envolver ações que visem melhorar a produtividade agrícola e o apoio a pequenos produtores para a aplicação de uma agricultura sustentável¹.

Várias intervenções que visem à diversificação alimentar e ao aumento no consumo de micronutrientes suplementações, fortificação e biofortificação têm sido adotadas para combater a desnutrição em todo o mundo (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2019; MEYER *et al.*, 2013). Apesar da adoção da fortificação de vários alimentos, estes são caros e não podem ser adquiridos pela população de baixa renda (KUMAR; PANDEY, 2020). No caso do Fe, outro fator influenciador dessa realidade é que são utilizados compostos pouco

¹ Disponível em: <<https://www.undp.org/sustainable-development-goals#zero-hunger>>. Acesso em 07 de jan. de 2022.

solúveis, para evitar um sabor metálico indesejável, ocorrendo o aumento total do mineral, mas a biodisponibilidade continua baixa (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017).

Outra maneira de aumentar o valor nutricional de sementes é a biofortificação, utilizando conhecimentos de práticas agronômicas, ferramentas transgênicas e programas de melhoramento (SILVA *et al.*, 2021). A biofortificação é a maneira mais viável para reduzir o problema de desnutrição entre as populações rurais desmerecidas e desnutridas de maneira mais econômica (KUMAR; PANDEY, 2020). O trabalho de biofortificação tem vantagem em relação à fortificação de alimentos para a nutrição de ferro porque as plantas podem ser projetadas e melhoradas para aumentar a bioacessibilidade (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017), sendo que o aumento do valor nutricional na parte comestível das culturas pode ser alcançado por técnicas transgênicas ou práticas agronômicas (KUMAR; PANDEY, 2020). Com isso, nos países em desenvolvimentos, em vez de uma única abordagem mais cara e menos acessível, como a fortificação e a suplementação, a população rural necessita de uma combinação de várias abordagens de baixo custo para reduzir a deficiência de nutrientes (KUMAR *et al.*, 2019), como plantas cultivadas e distribuídas, usando as práticas agrícolas existentes sem custos recorrentes além daqueles associados à agricultura normal (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017).

No caso específico do feijão, o melhoramento genético busca obter variedades que apresentem resistências à doença, alta produtividade e características de mercado aceitáveis (forma, tamanho, cor e brilho). As sementes melhoradas devem possuir características nutricionais desejáveis, com maiores concentrações de proteínas e minerais (MESQUITA *et al.*, 2007). Com relação ao Fe e ao Zn, as plantas adquirem da rizosfera circundante e do ambiente imediato, pois os minerais não são sintetizados na planta, assim as estratégias de melhoramento genético com o objetivo de biofortificar o feijão com esses minerais devem levar em consideração as condições de absorção das raízes para que elas possam “puxar” nutrientes do solo e “empurrá-los” para as partes comestíveis das plantas através do transporte, da remobilização e do armazenamento (KUMAR *et al.*, 2019). No caso de ferro e zinco, outra barreira da biofortificação é a baixa biodisponibilidade, o que exige uma maior quantidade desses micronutrientes presente (KUMAR; PANDEY, 2020).

2.5 Melhoramento genético do feijão-caupi

Estudos de biofortificação de micronutrientes em plantas são importantes, pois os nutrientes da dieta humana são, em sua maioria, obtidos delas (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017).

Porém, a quantidade de micronutrientes em culturas, especificamente grãos e leguminosas, pode estar sujeita a mudanças negativas (HOFFMANN; KOELLNER; KASTNER, 2021). HOFFMANN; KOELLNER; KASTNER, (2021) relata ainda que até 2050 as mudanças climáticas poderão diminuir a disponibilidade de ferro e zinco em até 8% e 5%, atingindo, principalmente, as regiões que hoje já sofrem com a fome oculta.

Em feijão, os métodos de melhoramento genéticos mais utilizados são introdução de germoplasma, seleção massal em cultivares locais, seleção de planta individual com teste de progênie em cultivares locais, método genealógico, método da descendência de uma única semente, método da descendência de uma única vagem e método dos retrocruzamentos (FREIRE FILHO, 2011), sendo que o método genealógico e a descendência de uma única vagem são os mais utilizados. Os programas de melhoramento permitiram o lançamento de várias cultivares comerciais, entre elas, têm-se as BRS Pujante, BRS Xiquexique, BRS Cauamé, BRS Tumucumaque, BRS Pajeú, BRS Potengi, BRS Itaim, BRS Juruá, BRS Aracê, BRS Acauã, BRS Carijó, BRS Tapaihum, Miranda IPA 207 e BRS Imponente (COSTA, 2020).

Diferentes programas desenvolvidos pela Embrapa e outras instituições públicas e privadas possibilitaram o desenvolvimento, por meio do melhoramento genético, de 73 cultivares de feijão-caupi no Brasil. A Embrapa Meio-Norte, há mais de 25 anos, desenvolve ações de melhoramento genético em Teresina-PI, buscando, entre outros, a obtenção de cultivares com grãos padronizados e de melhor qualidade genética, ciclo de maturação mais precoce, possibilidade de colheita mecanizada e ainda cultivares com alto valor nutritivo (ROCHA *et al.*, 2016). Como exemplo de resultado, tem-se a cultivar BRS Guariba, que em 2007 possibilitou o início da exportação de feijão-caupi para o Canadá, Portugal, Israel, Turquia e Índia e, em 2014, respondeu por 85% das exportações de feijão-caupi do Brasil para o Oriente Médio, a Ásia e a Europa. Outra cultivar considerada boa para a exportação é a BRS Tumucumaque que superou a BRS Guariba, em 2015, com relação à área plantada.

Entre a característica de alto valor nutricional estudos com a biofortificação de feijão-caupi também são realizados e até o momento da escrita deste material, já ocorreu o lançamento de três cultivares com concentrações elevadas de ferro e zinco, sendo elas a BRS Aracê, BRS Xiquexique e BRS Tumucumaque (ROCHA *et al.*, 2016). De acordo com as concentrações de 60 mg kg⁻¹ e de 40 mg kg⁻¹ para ferro e zinco, respectivamente, há cinco cultivares ricas em ferro (BRS Xiquexique, BRS Tumucumaque, BRS Potengi, BRS Juruá e BRS Aracê) e seis ricas em zinco (BRS Xiquexique, BRS Tumucumaque, BRS Cauamé, BRS

Juruá, BRS Itaim e BRS Aracê), sendo que as cultivares BRS Juruá, BRS Aracê, BRS Xiquexique e BRS Tumucumaque são ricas em ambos os elementos (FILHO, 2011).

2.6 Cultivares BRS Aracê, BRS Xiquexique, BRS Tumucumaque e BRS Guariba

A lei N° 9.456, de 25 de abril de 1997, define cultivar como qualquer gênero ou espécie vegetal que seja claramente distinguível de outras e que seja homogênea, estável e passível de uso pelo complexo agroflorestal. Para ser considerada uma nova cultivar, ela não deve ter sido vendida há mais de doze meses no Brasil ou quatro anos em outros países (ex. feijão) em relação à data do pedido de proteção (BRASIL, 1997).

Entre as cultivares de feijão-caupi, BRS Aracê, Guariba, Tumucumaque e Xiquexique, apenas para a Guariba não são realizados estudos que visem à biofortificação de ferro e zinco. Informações sobre essas cultivares relatadas a seguir foram retiradas do catálogo das cultivares disponibilizado no site² da Embrapa e disponibilizadas por FILHO, 2011.

BRS Aracê: apresenta grãos na cor verde de tamanho médio-grande, com alta concentração de ferro e zinco e de grande apelo para o mercado de vagens. Foi desenvolvida por meio do melhoramento genético genealógico e lançada em 2009. Apresenta adaptação ao bioma Caatinga, principal ecossistema da região Nordeste, fazendo com que essa cultivar seja mais indicada para os produtores de feijão-caupi dessa região.

BRS Guariba: a cultivar BRS Guariba pertence à subclasse comercial branco liso, a mesma das cultivares BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique. Com ciclo de maturação precoce, porte da planta semiereto, foi a grande responsável por alavancar o cultivo do feijão-caupi nos cerrados, especialmente, do Centro-Oeste, do Brasil, notadamente no Mato Grosso, e Meio-Norte do Brasil. Desenvolvida por melhoramento genético por descendência de uma única vagem e lançada em 2004, é indicada para o consumo interno e externo, sendo possível o cultivo por agricultores empresariais e familiares de pequeno porte.

BRS Tumucumaque: desenvolvida por melhoramento genético por descendência de uma única vagem e lançada em 2009, apresenta grande aceitação comercial, e possui altas concentrações de ferro e zinco, tem um cozimento rápido e um excelente aspecto visual após o preparo e pode ser cultivada tanto para o mercado de grãos secos, quanto para o de vagens e grãos verdes. Considerando o cultivo visando a grãos secos, tem as mesmas indicações da cultivar BRS Guariba com relação à agricultura e ao consumo.

² Disponível em: <<https://www.embrapa.br/meio-norte/cultivares>>. Acesso em: 14 de Jan. de 2022.

BRS Xiquexique: lançada em 2008, foi desenvolvida por melhoramento genético através de descendência de uma única vagem. A cultivar BRS Xiquexique apresenta ciclo de maturação médio-precoce e apresenta grãos do tipo comercial branco liso com altas concentrações de ferro, zinco, proteína e rápido cozimento. Assim, como a BRS Aracê, apresenta alta tolerância à seca, sendo também indicada para o clima semiárido da região Nordeste do Brasil. A sua produção e o seu consumo são mais indicados para a agricultura familiar e o mercado interno.

2.7 Microminerais

Uma classificação dos minerais é com base nas necessidades fisiológicas diárias: assim macrominerais (sódio, potássio, cálcio, fósforo e magnésio) são aqueles de que o corpo humano saudável precisa de aproximadamente 100 mg dia⁻¹; e microminerais (ferro, zinco, cobre, cromo e selênio) são aqueles cujas necessidades são relativamente próximas de 20 mg dia⁻¹ (BECK *et al.*, 2021). O magnésio, presente em todas as células, está entre os quatro minerais mais abundante nos sistemas biológicos, participando de vários sistemas enzimáticos, como o metabolismo de açúcares e ainda na produção da principal molécula transportadora de energia do organismo, o ATP (BARAN, 2005; BUENO, 2008; PEIXOTO, 2000). As suas fontes principais são cereais integrais, leguminosas, nozes, espinafre, tubérculos e vegetais folhosos verdes escuros (BUENO, 2008; KUANG *et al.*, 2021; SEVERO *et al.*, 2015). A carência desse macromineral pode estar relacionado a desordens neuromusculares, osteoporose, acidente vascular cerebral, arritmias cardíacas, hipertensão arterial, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (KUANG *et al.*, 2021; SEVERO *et al.*, 2015)

Legumes e verduras estão entre os alimentos mais comuns na dieta do homem e são responsáveis, junto com a água, pelo fornecimento diário de micronutrientes (MATOS-REYES *et al.*, 2010; PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Na aquisição desses micronutrientes, as plantas desenvolvem mecanismos que vão desde a aquisição até o transporte e o fornecimento de cátions para locais específicos (PINTO; FERREIRA, 2015). Porém elementos que não são essenciais para as plantas podem ser essenciais para humanos (Ex: Se e Co) e, mesmo em situações nas quais o mineral é essencial para ambos (Zn, Cu e Fe), pode ocorrer da sua concentração ser baixa ou de estarem presentes em formas que não podem ser utilizadas pelos seres humanos (Ex.: Fe) (PINTO; FERREIRA, 2015; SANITÀ DI TOPPI; THOMINE, 2021).

Como qualquer outra leguminosa, o feijão é cultivado diretamente no solo, local que contém uma grande quantidade de elementos essenciais aos organismos, como ferro (Fe), magnésio (Mg), cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) (PINTO; FERREIRA, 2015), sendo que solos acidificados por fertilização, por exemplo, aumenta a solubilidade, elevando com isso a transferências de elementos para a cadeia alimentar (ZHAO *et al.*, 2022). Como possuem semelhanças nas propriedades físico-químicas, alguns elementos são transferidos para os tecidos vegetais por meio dos transportadores de outros elementos, como é o caso do transporte de Ca, que envolve o Pb e de Fe, Mn, e Zn, que envolve o Cd (ZHAO *et al.*, 2022). Em outra situação, a diminuição de um elemento pode provocar o aumento de outro. Um exemplo disso é a deficiência de ferro em plantas, o que pode levar ao aumento na absorção de Zn, Mn, Co e de Cd (ZHAO *et al.*, 2022).

Zn, Cu e Fe são essenciais para as plantas (cofatores em estruturas de metaloproteínas e sítios catalíticos), porém, mesmo com adaptações para tolerar essas alterações, variações na quantidade necessária (acima ou abaixo) podem levar à planta morte (SANITÀ DI TOPPI; THOMINE, 2021). Alimentos, água, poeira (inalação ou ingestão) são as principais vias de contato dos seres humanos com elementos, sejam eles essenciais, sejam eles tóxicos (ZHAO *et al.*, 2022). O homem precisa ingerir elementos essenciais, já que não são sintetizados pelo corpo (PEREIRA *et al.*, 2020b). Esses nutrientes, nas quantidades adequadas, promovem muitas reações enzimáticas e processos fisiológicos (PEREIRA *et al.*, 2020b; SANTOS *et al.*, 2018), já a sua deficiência pode trazer anormalidades estruturais e fisiológicas, e a quantidades acima dos limites necessários pode ser prejudicial (SANTOS *et al.*, 2018). A seguir são apresentadas algumas características dos micronutrientes Cu, Mn, Fe e Zn.

2.7.1 Cu e Mn

Atrás apenas do ferro e zinco, o cobre é o terceiro elemento do bloco *d* mais abundante no corpo humano (SILVA *et al.*, 2019). Está presente em diversos aminoácidos, peptídeos de baixo peso molecular, sendo que estas substâncias estão relacionadas com atividade anti-inflamatória, antiulcerosa, anticonvulsivante e até anticarcinogênica (BARAN, 2005). Excesso de cobre no organismo está relacionado com casos de danos oxidativos, artrite reumatoide, distúrbios neurodegenerativos, câncer e doença de Wilson (BARAN, 2005; SARGENTELLI, 1996). A doença de Wilson é uma mutação gênica que reduz a excreção de cobre e ocasiona alterações nas funções renais e cardíaca (SÓCIO *et al.*, 2010). No caso da deficiência, existe a desordem genética que dificulta o transporte de cobre intracelular,

provocando uma diminuição do micromineral e com isso levando a uma rápida degeneração cerebral (BARAN, 2005). Nos alimentos, o cobre está presente em carnes, frutos do mar, em muitos vegetais, cereais e nozes (SARGENTELLI, 1996).

Já o manganês (Mn) atua como ativador de diversas enzimas, sendo essencial na síntese do colesterol e do neurotransmissor dopamina (AFONSO, 2019). A ingestão de legumes, cereais integrais, verduras e frutas fornecem manganês para o metabolismo (AFONSO, 2019). Ressalta-se que a forma Mn^{2+} é a forma utilizável biologicamente, o seu excesso causa problemas respiratórios e neurológicos (AFONSO, 2019). Deficiência na ingestão desse micronutriente pode causar perda de peso, alteração da síntese de insulina, redução da taxa de colesterol no sangue e malformações fetais (AFONSO, 2019). Pode ocasionar ainda o Parkinson mangânico (problema no movimento corporal) (ROCHA; AFONSO, 2012).

2.7.2 Zn e Fe

Os micronutrientes ferro e zinco estão entre os quatro mais importantes para o ser humano e a sua ingestão em quantidade deficiente afeta milhares de pessoas carentes em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (MEYER *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014). O zinco (Zn) está presente em todos os órgãos e se concentra principalmente nos ossos, músculos voluntários, fígado e pele (MAFRA; COZZOLINO, 2004). O zinco pode ser ingerido através do consumo de mariscos, carnes vermelhas, fígado, nozes e leguminosas (MAFRA; COZZOLINO, 2004). O corpo não tem sistema de reserva de zinco, assim é necessário um suprimento regular desse elemento fundamental nos processos celulares (MEYER *et al.*, 2013).

A ingestão ou absorção inadequada de zinco é a principal causa de sua deficiência em humanos. A sua ingestão em quantidade insuficiente pode provocar desordens emocionais, diminuição da resposta imunológica e anorexia nervosa (BARAN, 2005). O excesso de zinco pode ocasionar a deficiência de cobre e distúrbios fisiológicos que afetam os sistemas gastrointestinal, epidérmico, nervoso central e reprodutivo (OKWUONU *et al.*, 2021). No mundo, a deficiência de zinco acomete um terço da população mundial, podendo chegar a 73% em algumas regiões menos desenvolvidas (OKWUONU *et al.*, 2021).

No mundo, a deficiência de zinco (Zn) é a segunda deficiência nutricional mais comum, afetando principalmente países de baixa e média renda (SILVA *et al.*, 2021). O Brasil não tinha dados sobre a deficiência de zinco, porém em 2021 foi publicado um estudo

realizado em 123 municípios brasileiros entre fevereiro de 2019 e março de 2020 com 14.583 crianças menores de cinco anos. Segundo esse levantamento a prevalência de deficiência de zinco no Brasil e no Nordeste foi de 17,8% e 15,1%, respectivamente, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre as macrorregiões, a idade, o sexo, a cor ou a raça (UFRJ, 2021).

O ferro é o metal de transição mais abundante no corpo humano (BARAN, 2005). Participa do metabolismo do oxigênio, o transporte de elétrons e de centros catalíticos de enzimas (BARAN, 2005). Entre as principais fontes de ferro na dieta humana temos as carnes, cereais, legumes, frutas e vegetais (FEITEIRA; BARREIROS; PACHECO, 2021). A deficiência de ferro pode levar a anemia ferropriva, que resulta em hemácias microcíticas e hipocrômicas, sendo o tipo mais comum no mundo e afeta, principalmente, crianças menores de 2 anos e mulheres grávidas (ALSALEEM *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2014). Essa anemia causada pela deficiência de ferro no organismo é causada não só pela baixa ingestão alimentar desse micronutriente, mas também por fatores que alteram sua biodisponibilidade (PEREIRA *et al.*, 2016).

Segundo o mesmo levantamento realizado com zinco, a prevalência de anemia ferropriva no Brasil é de 3,6%, sendo a região Nordeste, com 2,7%, a de menor prevalência. Crianças menores apresentaram maiores prevalência de anemia ferropriva, sendo no Brasil de 8% para crianças de 6 a 23 meses e de 1,3% para crianças com 24 a 59 meses. Já no Nordeste, os valores para as respectivas faixas foram de 7,2 e 0,4%, respectivamente (UFRJ, 2021). Outro estudo realizado em 2021, que realizou uma metanálise, incluindo 134 publicações de 2007 a 2020, observou prevalência estimada de anemia de 33% em crianças brasileiras e menores de sete anos (SBP, 2021).

2.7.3 Limites diários recomendados de Cu, Fe, Mg, Mn e Zn

Valores de Cu, Fe, Mg, Mn e Zn que se deve ingerir diariamente depende de alguns fatores como sexo, massa corporal e idade. Para esses valores existem algumas definições importantes, como Ingestão Dietética de Referência (DRI) que indica um valor de referência utilizado para se avaliar a ingestão de nutrientes em indivíduos saudáveis (IOM, 2019). Na DRI, segundo IOM, 2019), tem-se:

- Ingestão Dietética Recomendada (RDA): valor médio de ingestão necessário para atender às necessidades nutricionais de 97%-98% das pessoas saudáveis.

- Ingestão Adequada (AI): valor que garante a adequação nutricional. É estabelecido quando as informações são insuficientes para desenvolver uma IDR.
- Nível de ingestão superior tolerável (UL): valor máximo que pode ser ingerido sem causar problemas à saúde.

No Quadro 3 a seguir, é apresentada a ingestão dietética recomendada pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos (IOM, 2019) e pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) de número 269, de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005).

QUADRO 3: Quantidade, em mg, recomendada para a ingestão de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg.

Nutrientes	Indivíduo	IOM, 2019	RDC 269/2005
Ferro	Homens	8,00	14,00
	Mulheres	18,00	14,00
	Crianças de 1 a 3 anos	7,00	6,00
	Mulheres gestantes	27,00	27,00
Zinco	Homens	11,00	7,00
	Mulheres	8,00	7,00
	Crianças de 1 a 3 anos	3,00	4,00
	Mulheres gestantes	11,00	11,00
Cobre	Homens	0,90	0,90
	Mulheres	0,90	0,90
	Crianças de 1 a 3 anos	0,34	0,34
	Mulheres gestantes	1,00	1,00
Manganês*	Homens	2,30	2,30
	Mulheres	1,80	2,30
	Crianças de 1 a 3 anos	1,20	1,20
	Mulheres gestantes	2,00	2,00
Magnésio	Homens	400,00	260,00
	Mulheres	310,00	260,00
	Crianças de 1 a 3 anos	80,00	60,00
	Mulheres gestantes	350,00	220,00

*Ingestão Adequada (IA).

Destaca-se nas informações do Quadro 3 que a RDC 269/2005 não faz distinção entre os valores para os adultos em homens e mulheres e apenas uma quantidade para ambos. Apesar da IOM, (2019) informar valores diferentes de acordo com a faixa etária de homens, mulheres e mulheres gestantes, no Quadro 3 foram expostos apenas os valores para a faixa etária de 19 a 30 anos. Com exceção de Mg, a quantidade recomendada para gestantes é igual nas duas recomendações. Já para crianças de 1 a 3 anos de idade apenas as quantidades de

cobre e manganês é semelhante nas duas recomendações. Para esse mesmo grupo, a RDC 269/2005 indica quantidades para ferro e magnésio inferior ao indicado pelo IOM, (2019).

Outro detalhe sobre os dados do Quadro 3 é que para o Manganês, apesar dos valores serem semelhantes, a IOM, (2019) indica-o como Ingestão Adequada (AI) já ANVISA, (2005) informa-os como Ingestão Dietética Recomendada (RDA). Com relação à UL para Cu, Fe, Mn e Zn, em adultos, são indicados valores diários de 10, 45, 11 e 40 mg (IOM, 2019). Neste trabalho, serão utilizadas as informações da ANVISA, (2005) em todos os cálculos relacionados com a ingestão de micronutrientes. Nos Estados Unidos, em 2020, houve uma atualização na DRI de alguns nutrientes, porém não foram observadas informações sobre os nutrientes Cu e Mn e não ocorreram alteração nos valores de Fe, Zn e Mg nos grupos que constam no Quadro 3 (USDA, 2020).

2.8 Bioacessibilidade e biodisponibilidade

Conhecer a concentração total de elementos presentes no alimento não fornece informações sobre a fração que pode ser bioacessível e biodisponível. Ao ingerir um alimento, parte dos nutrientes são liberados da matriz e ficam disponíveis para serem absorvidos (bioacessibilidade) sendo uma parcela deles absorvidos e com isso atingindo a circulação sanguínea do trato gastrointestinal e se disponibilizando para utilização ou armazenamento.

Além disso ocorrem o transporte, a captação celular e a conversão do micronutriente em uma forma biologicamente ativa, ou seja, encontra-se disponível para atender às demandas fisiológicas do organismo (biodisponibilidade) (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020b; PEREIRA; TAVANO, 2014; SANTOS *et al.*, 2018). Vale ressaltar que algumas substâncias não precisam ser ingeridas e digeridas para serem absorvidas e outras mesmo passando pelo processo de digestão, não são absorvidas (SANTOS *et al.*, 2018).

Para se estimar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de uma substância ingerida, podem ser utilizados métodos *in vivo* ou *in vitro* (MOREDA *et al.*, 2011). Os *in vivo*, considerado um tipo de teste antiético, utilizam animais e uma demanda rígida de condições éticas, além de profissionais especializados, infraestrutura específica (MOREDA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2018). Com isso, tem se estimado a biodisponibilidade por meio de vários métodos *in vitro* (MOREDA *et al.*, 2011). Os *in vitro* são baseados na extração seletiva ou na simulação da fisiologia do trato gastrointestinal (SANTOS *et al.*, 2018). Buscam-se simular as condições de temperatura, agitação, pH e composição enzimática e química encontradas no corpo humano durante a digestão (MOREDA *et al.*, 2011). Além de

apresentar aproximações eficazes para situações *in vivo*, esses métodos *in vitro* têm as vantagens de serem simples, rápidos, de alta precisão, de fácil controle das condições e com uma boa reprodutibilidade (MOREDA *et al.*, 2011).

Nesse processo de absorção do micronutriente, a matriz alimentar tem papel importante, pois fornece substâncias que interagem quimicamente (promotores ou inibidores) e que podem estimular ou retardar sua liberação (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017). Fatores como as formas químicas de elementos, interações com outras espécies presentes na matriz e condições fisiológicas do consumidor (idade, saúde) influenciam na bioacessibilidade e biodisponibilidade (MOREDA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2020b). Por exemplo, a diferença da biodisponibilidade do zinco em relação ao ferro é atribuída, entre outros, ao fato de que o zinco está altamente associado a enzimas e proteínas e se encontra em local diferente do ferro nas sementes (PEREIRA *et al.*, 2014).

Para o ferro presente em carnes, o estado de oxidação favorável e a forma complexada ferritina-ferro em que é armazenada facilitam a liberação desse mineral (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017). Para ser absorvido, o Fe^{3+} , predominante nas dietas, deve ser reduzido a Fe^{2+} , assim qualquer componente que impeça essa redução, devido principalmente à formação de complexos insolúveis, diminui a absorção de ferro (PEREIRA *et al.*, 2014). A vitamina C também tem a capacidade de facilitar a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} (KUMAR; PANDEY, 2020). Outros fatores que podem facilitar a absorção são a concentração total de proteína, de alguns aminoácidos, como cisteína, histidina e metionina e ainda de fosfatos, de ácidos orgânicos e de algumas prostaglandinas (MAFRA; COZZOLINO, 2004).

Já a caseína (proteína presente nas dietas), o fitato, o oxalato e os polifenóis vegetais (tanino) são inibidores e reduzem a bioacessibilidade de ferro e zinco devido à formação de complexos insolúveis (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017). Em leguminosas, o ácido fítico, forma principal de armazenamento de fósforo, forma complexos com cátions divalentes (Ca, Mg, Cu, Fe e Zn) e com isso reduz sua solubilidade, dificultando assim a disponibilidade desses minerais (MEYER *et al.*, 2013; KUMAR; PANDEY, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Existe ainda a possibilidade de ocorrência de algumas competições entre os micronutrientes, já que o ferro, se fornecido junto com Zn, através de suplemento, pode ter efeito negativo na sua absorção (MAFRA; COZZOLINO, 2004).

Outras substâncias que estão presentes em leguminosas e que reduzem a biodisponibilidade de micronutrientes são saponinas, latirógenos, inibidor de protease e inibidores de α -amilase (KUMAR; PANDEY, 2020).

Com isso, estudar a bioacessibilidade de minerais em diferentes cultivares de feijão é importante para que as informações do real percentual liberado e absorvido levem ao desenvolvimento de estratégias que ajudem a combater a carência nutricional com a introdução de novas variedades na dieta da população, principalmente nas populações de baixa renda (PEREIRA *et al.*, 2016; PEREIRA; TAVANO, 2014).

2.9 Compostos fenólicos

Os feijões possuem qualidades nutricionais como baixo índice glicêmico e característica de saciedade devido a concentrações significativas de proteínas, carboidratos, pequena quantidade de lipídios, calorias, aminoácidos (tiamina e niacina), fibras dietéticas, compostos bioativos e são ricos em vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina K, vitamina B6) e minerais (ferro, zinco, manganês, cobre, magnésio, cálcio, fósforo e potássio) entre outras substâncias que são vitais para o funcionamento metabólico normal do corpo humano (BARROS *et al.*, 2017; COUTINHO *et al.*, 2014; MESQUITA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2020b, 2014; PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019; SOMBIÉ *et al.*, 2018; TORMENA *et al.*, 2021). Os feijões apresentam ainda uma quantidade expressiva de compostos fenólicos que são conhecidos por ação preventiva contra diversas doenças, como diabetes, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (PEREIRA *et al.*, 2020b; PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Os compostos possuem potencial para proteger o corpo contra doenças crônicas (câncer, envelhecimento, diabetes e doenças cardiovasculares), sendo o grupo mais importante de compostos bioativos do feijão (BARROS *et al.*, 2017; MESQUITA *et al.*, 2007; SOMBIÉ *et al.*, 2018). Localizam-se principalmente no tegumento do grão de variedades coloridas, sendo que esses compostos, além de inibir enzimas digestivas, formam complexos insolúveis com proteínas, tornando-as indisponíveis (MESQUITA *et al.*, 2007; REIS; SILVA, 1999).

A maior parte da coloração presente nos feijões provém dos compostos fenólicos, principalmente de ácidos fenólicos e de flavonoides e de outros, como antocianinas, proantocianidinas e isoflavonas, que podem formar complexos com ferro (BARROS *et al.*, 2017; MESQUITA *et al.*, 2007; SOMBIÉ *et al.*, 2018). A composição fenólica e as suas propriedades bioativas podem variar consideravelmente dependendo da cultivar de feijão-caupi (SOMBIÉ *et al.*, 2018). Um estudo relatado com feijões de diferentes cores branco, vermelho, pinto e preto mostrou que as sementes de cor branca apresentam mais ferro

biodisponível, demonstrando que flavonoides presentes nos feijões coloridos e ainda os ácidos fenólicos e taninos afetam negativamente a biodisponibilidade do ferro (PEREIRA; TAVANO, 2014).

2.10 Processamento do alimento

A retirada da semente das vagens, a sua imersão em água e o seu tratamento térmico com ou sem pressão são etapas comuns no preparo de feijões (PEREIRA *et al.*, 2020b). Em alguns desses processamentos, apesar de ocorrer redução do valor nutricional, podem aumentar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de micronutrientes devido à remoção de inibidores e à liberação dos micronutrientes da matriz alimentar (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017). Entre esses processamentos, segundo DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, (2017), temos o descascamento, a moagem, a imersão, a fermentação e o aquecimento. O descascamento provoca a perda significativa de minerais presentes no tegumento, e a remoção de fitatos não é significativa, pois eles estão presentes também no cotilédone.

A moagem dos grãos provoca a degradação da sua parede celular, fazendo com que se aumente a biodisponibilidade, apesar dos níveis de minerais de ferro e zinco e ainda de fitatos serem reduzidos. A imersão, apesar de reduzir os níveis de fitato devido à solubilização e/ou à ativação de fitases endógenas, provoca uma lixiviação de minerais, reduzindo com isso a quantidade total presente. Já a fermentação, além de degradar o fitato pela ação das fitases microbianas, aumenta a absorção de ferro e zinco devido à formação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular durante esse processo (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017).

Já o tratamento térmico suaviza as paredes celulares, o que provoca a remoção de inibidores e o aumento da absorção de minerais, além de não provocar perdas de minerais nas temperaturas usadas (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2017). Ele provoca o amolecimento da matriz alimentar, a perda da integridade da estrutura celular e ainda a diminuição da atividade de certos compostos antinutricionais e de inibidores de proteases provocando a migração de componentes por lixiviação, melhorando a digestibilidade e a liberação dos micronutrientes ligados à proteína, por exemplo (BARROS *et al.*, 2017; MEYER *et al.*, 2013; MESQUITA *et al.*, 2007; PEREIRA; TAVANO, 2014). Porém, em alguns tratamentos térmico é realizada a imersão e o descarte da água para posterior cozimento (tratamento térmico), provocando a lixiviação e a perda de alguns minerais (PEREIRA *et al.*, 2020b).

2.11 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Entre as técnicas utilizadas para a análise de oligoelementos em alimentos, podem-se citar a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS), a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS), a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICPOES) e a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) (DUFAILY; NOËL; GUÉRIN, 2006). A concentração extremamente baixa de metais e as interferências são limitações que dificultam medidas precisas. Assim, avanços tecnológicos foram necessários e hoje, utilizando técnicas analíticas sofisticadas como o uso de um ICP-MS para a quantificação simultânea de metais traço em amostras de alimentos melhoraram, significativamente a retirada dessas limitações (SAMANTA *et al.*, 2021).

Em feijão podem existir, como já relatado, elementos essenciais e elementos considerados potencialmente tóxicos para o homem (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Com isso, há preocupações nutricionais relacionadas às análises inorgânicas de produtos alimentícios (RODUSHKIN *et al.*, 2008). Nessas análises, é recomendado um controle de qualidade para garantir a segurança alimentar e, para isso, técnicas de análise multielementar com alta sensibilidade e capacidade de determinar a composição isotópica são bastante utilizadas (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é capaz de realizar análise multielementar de traços e ultratraços, sendo considerada uma das mais poderosas técnicas analíticas disponíveis (ILIO *et al.*, 2011). Possui baixo limite de detecção, ampla faixa dinâmica linear, espectros simples e possibilidade de medir razões isotópicas atômicas. Porém, como principal desvantagem, ou limitações, têm-se os efeitos de interferências (CARDOSO; GANIO; ROBERTS, 2019; DUFAILY; NOËL; GUÉRIN, 2008; KERO; MOORE; MALSON, 2012; PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Com relação a essas interferências, a principal ocorre quando uma espécie tem o mesmo valor da razão carga massa (m/z) do analito (**interferências espectrais**) (ILIO *et al.*, 2011). Íons isobáricos, simples ou íons poliatômicos (entre eles os óxidos refratários) e íons com carga dupla podem provocar esse tipo de interferência (LINKS, 2011; SKOOG, 2009).

No caso dos íons poliatômicos, a interferência é formada devido às interações entre as espécies do plasma, da matriz e da atmosfera. É muito comum em valores de m/z entre 40 e 82, sendo que, em analitos de massas mais baixas, predominam as interferências devido a espécies de gás com C, N, O e H (ILIO *et al.*, 2011). Interferências para ^{56}Fe e ^{66}Zn podem ser

os íons poliatômicos $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ (PICK; LEITERER; EINAX, 2010) e $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$ (MAY; WIEDMEYER, 1998).

Apesar de em condições plasmáticas muitas ligações serem quebradas, os óxidos podem permanecer parcialmente associados (ILIO *et al.*, 2011). A interferência por formação de óxidos e hidróxidos pelo analito, matriz dos componentes, solvente e gases do plasma é considerada a mais crítica em análises no ICP-MS (SKOOG, 2009). Um exemplo desse tipo de interferência são os óxidos de $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ e $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ que interferem na análise de $^{56}\text{Fe}^+$ (SKOOG, 2009).

Outro tipo de interferência é chamado de efeito de matriz, em que, uma alta concentração de qualquer elemento na matriz pode reduzir (mais comum) ou aumentar o sinal do analito. Até 2011 nenhuma abordagem equivalente estava disponível para eliminar sistematicamente interferências não espectrais (AGATEMOR; BEAUCHEMIN, 2011).

Atualmente, uma forma de eliminá-las é com o uso de padrões internos apropriados, isto é, pela introdução de um elemento que está ausente nas amostras e que tem uma massa atômica e potencial de ionização próximo ao daqueles do analito e ainda com distribuição homogênea na amostra e no padrão e que não provoquem interferências espectrais (CORAZZA *et al.*, 2016; SKOOG, 2009). Com isso os padrões internos adicionados (índio, germânio, ítrio e o ródio) melhoram a precisão e exatidão, porém a dificuldade em se trabalhar com padrão interno é encontrar uma substância adequada para servir como tal e introduzir essa substância tanto na amostra como nos padrões de modo reprodutível, pois o padrão interno deve fornecer um sinal que seja similar ao sinal do analito em vários aspectos, mas suficientemente diferente para ser distinguível pelo instrumento (CORAZZA *et al.*, 2016; SKOOG, 2009). Destaca-se que em alguns casos ocorre a utilização de múltiplos padrões internos para otimizar a semelhança das características dos padrões com aquelas dos vários analitos ((FERNANDES *et al.*, 2003; SKOOG, 2009).

Para a eliminação de interferências espectroscópicas em análises de elementos em concentrações muito baixa é com o uso de equipamentos mais modernos. Uma das melhorias considerada bastante significativa foi a introdução nos instrumentos de ICP-MS da Micromass, Perkin Elmer Sciex, Agilent ou Thermo Electron de células de reação/colisão, em que, um gás inerte (colisão) ou reativo (reação) é inserido para aumentar a seletividade da medição, reduzindo interferências isobáricas poliatômicas (BECKER, 2005; ILIO *et al.*, 2011; KERO; MOORE; MALSON, 2012).

Um desses equipamentos é o ICP-MS triplo quadrupolo que remove de forma bastante eficiente sobreposições isobáricas (NELSON; LOPEZ-LINARES, 2019; SANTOS *et al.*,

2018). No modo quadrupolo de padrão único (SQ) ou no MS/MS em tandem o ICP-MS com triplo quadrupolo (ICP-QQQ-MS), reduzem-se as interferências. No modo MS/MS, operando com célula de colisão, ocorre o filtro dos isótopos de razão massa/carga de interesse no quadrupolo (Q1) antes da introdução no quadrupolo de guia de íons (Q2), que pode ser preenchido com um gás de colisão. Por último, no quadrupolo final (Q3) ocorre a filtração novamente do analito desejado, em sua massa original (BISHOP *et al.*, 2015). As colisões do analito com as moléculas do gás (por exemplo, hélio ou argônio) ou da mistura de gases de colisão geram uma reação de íons que produz um “resfriamento” (reduz a propagação de energia) dos íons de vários eV para valores inferiores a 0,1 eV, e ainda a neutralização de íons atômicos interferentes (ex. argônio) e a dissociação dos íons moleculares (BECKER, 2005).

Outros procedimentos importantes que deve ser dado ao se trabalhar com análises no ICP-MS são a seleção do gás de reação/colisão mais apropriado e, dependendo do gás de reação/colisão escolhido, a realização de varreduras de íons do produto em diferentes vazões de gás, pois os mecanismos de reação e a intensidade dos sinais do analito correspondentes podem variar com a pressão do gás ou a concentração na célula (BALCAEN *et al.*, 2015). Apesar de cada elemento ter uma vazão ideal, uma única vazão pode ser usada, satisfatoriamente, para análise multielementar (ILIO *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 1
BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E ZINCO EM
SEMENTES DE FEIJÃO COMERCIAL E FEIJÃO-CAUPI (BIOFORTIFICADO E
NÃO BIOFORTIFICADO)

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a qualidade nutricional relacionada com a concentração de ferro e zinco em sementes cruas e cozidas de feijão-caupi biofortificado, não biofortificado e feijão comercial.

3.2 Específico

- Quantificar as concentrações total, bioacessível e biodisponível de ferro e zinco em sementes crua e cozidas de feijão-caupi biofortificado, não biofortificado e feijão comercial;
- Calcular as frações bioacessível e biodisponível de ferro e zinco em feijão-caupi biofortificado, não biofortificado e feijão comercial;
- Comparar as concentrações totais, bioacessíveis e biodisponíveis e correlacionar com a biofortificação.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes, padrões e materiais

Todos os reagentes usados são de qualidade analítica (P.A.) ou superior. Água desionizada ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de um Millipore RiOs-DI™ adquirido da Milli-Q (Billerica, MA, EUA) foi usada para a preparação de todas as soluções utilizadas nas análises dos elementos Fe e Zn. As soluções padrões de 1000 mg L^{-1} de Fe e Zn usadas para calibração foram adquiridas da PerkinElmer (Jardim das Laranjeiras, SP, Brasil). A *amilase* de *Aspergillus oryzae*, pepsina da mucosa gástrica suína, pancreatina do pâncreas suíno, sais biliares, NaHCO_3 , NaOH e membranas de diálise de celulose (14 kDa MWCO) foram fornecidas pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

O ácido clorídrico usado para ajustar o pH para digestão *in vitro* foi obtido na Synth (São Paulo, SP, Brasil). Peróxido de hidrogênio 30% (m/m), adquirido da Synth, foi usado para decomposição ácida das amostras. Um destilador Savillex DST-1000 (Eden Prairie, MN, EUA) foi usado para aumentar a pureza do ácido nítrico fornecido pela Synth. Os materiais usados foram cuidadosamente lavados com água e sabão sendo posteriormente enxaguados com água deionizada. Em seguida, potes plásticos, tubos cônicos e vidrarias foram deixados imersos em HNO_3 a 10% (v/v) por 24 h e lavados cuidadosamente com água deionizada.

4.2 Amostras de feijão

Uma amostra representativa de 1,0 kg da safra 2018/2019 das cultivares de feijão-caupi biofortificado BRS Xiquexique (XIQ), BRS Tumucumaque (TUM) e BRS Aracê (ARA) e não biofortificado BRS Guariba (GUA) foi fornecida pela Embrapa Meio-Norte (Teresina, PI, Brasil) enquanto as cultivares comerciais de feijão Preto (PRE), Branco (BRA), Carioca (CAR) e Sempre Verde (VER) foram adquiridas do lote 476 (BRA), 473 (CAR), 470 (PRE), 480 (VER) de uma mesma empresa em um supermercado popular da cidade de Teresina, Piauí, Brasil. As cultivares comerciais de feijão selecionadas são as mais produzidas e consumidas na região Nordeste do Brasil.

4.3 Preparo das amostras

Tratamento para amostras cruas: as sementes secas das diferentes cultivares de feijão foram finamente pulverizadas com moedor A 11BS1 (IKA, Staufen, Baden-Württemberg, Alemanha) operando a 50/60 Hz. O material foi armazenado em tubos plásticos hermeticamente fechados e mantidos em um dessecador.

Tratamento para amostras cozidas: o processo de cozimento foi realizado coletando ca. 10 g de feijão em tubo de teflon na presença de 20 mL de água deionizada. Os tubos foram lacrados e deixados em bloco de digestão (EasyDigest®, Analab, Wantzenau, França) por 1,5 h a 100 °C (Pereira *et al.*, 2014). Essa metodologia mimetiza as condições típicas de cozimento de grãos usando o bloco de digestão para controlar estritamente a temperatura e tubos de teflon selados para evitar contaminação e lixiviação.

Após o cozimento, a amostra foi transferida para um moedor de café Di grano (Cadence, Balneário Piçarras, SC, Brasil) e moída com auxílio de lâminas de aço inoxidável a 60 Hz. Essa etapa foi para simular a fase de mastigação do alimento. As amostras parcialmente moídas foram congeladas e liofilizadas por 48 h em liofilizador (L101, LIOTOP®, São Carlos, SP, Brasil). O material vegetal seco foi armazenado em tubos plásticos hermeticamente fechados e mantidos em dessecador.

4.4 Determinação da concentração total de Fe e Zn em sementes de feijão cru e cozida

Para a determinação da concentração total foi seguido a metodologia de PANIZ *et al.*, (2018), com algumas modificações. Assim, 200 mg de amostras de feijão seco e pulverizado foram colocadas em tubos de 50 mL. Em seguida, 2,0 mL de HNO_{3conc} subdestilado foi adicionado. A mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida, 200 µL de H₂O₂ foram adicionados e a digestão da amostra foi realizada mantendo os tubos a 85 °C por 3 h em um bloco de digestão. Após a decomposição, as soluções foram resfriadas e diluídas até 30 mL com água deionizada (fator de diluição 150). As amostras foram preparadas em triplicatas. O material de referência certificado, Farinha de Arroz 1568b (SRM *rice flour*) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), foi analisado em triplicata para verificar a exatidão do método utilizado. O procedimento de digestão usado para o material de referência certificado foi o mesmo usado para as amostras de sementes de feijão.

4.5 Digestão gastrointestinal *in vitro* de sementes de feijão

O protocolo de digestão gastrointestinal simulada *in vitro* aplicado para avaliar a bioacessibilidade e biodisponibilidade de Fe e Zn em sementes de feijão foi baseado no método descrito na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, 2000) e em trabalhos recentes (Bertin *et al.*, 2016; Júnior *et al.*, 2016; Leroux *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019; Pedron *et al.*, 2016) com ligeiras modificações. O protocolo consistia em três etapas focadas na simulação do processo de digestão dos alimentos na boca, estômago e intestinos de humanos. Esse método *in vitro* permite quantificar simultaneamente a concentração bioacessível e biodisponível de micronutrientes nas sementes da leguminosa.

Resumidamente, 200 mg foram colocados em tubos cônicos de 50 mL e em seguida adicionado 200 μ L da solução de α -amilase 1% (m/v) em tampão NaHCO_3 0,1 mol L^{-1} e pH 6,8. No estágio de digestão gástrica, 3 mL de uma solução de pepsina a 0,5% (m/v) pH 1,2 foram adicionados e a mistura foi incubada por 2 h a 37 °C sob agitação de 70 rpm. Ácido clorídrico concentrado foi usado para ajustar o pH a 1,2. Para a fase final da digestão, a fase intestinal, foram adicionados 3 mL de uma solução de pancreatina 3% (m/v) e sais biliares 2,5% (m/v) em tampão NaHCO_3 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. A solução de NaOH (1,5 mol L^{-1}) foi utilizada para ajustar o pH 7,4.

Uma membrana de diálise (14 kDa MWCO - 3 cm) preenchida com NaHCO_3 pH 7,4 também foi inserida no tubo. Após incubação por 2 h a 37 °C sob agitação de 70 rpm, os tubos foram mantidos em banho de gelo por 15 min para eliminação da atividade enzimática intestinal. Ao final da digestão gastrointestinal simulada, a membrana de diálise foi removida e lavada, e a solução interna (fração biodisponível) transferida para tubos cônicos e o volume completado para 15 mL com água deionizada. Finalmente, a suspensão gastrointestinal foi centrifugada a 3.000 rpm.

O sobrenadante (fração bioacessível) foi coletado e transferido para um tubo cônico de 50 mL para ser diluído para 30 mL com água desionizada. O protocolo foi realizado em triplicata. A solução do branco foi preparada com reagentes enzimáticos e não enzimáticos, exceto amostra, para corrigir possível contaminação. Para garantir a máxima atividade enzimática, cada solução utilizada nas etapas foi preparada imediatamente antes da aplicação do protocolo de digestão *in vitro*. As informações sobre a bioacessibilidade e biodisponibilidades dos minerais foi usado para o cálculo da contribuição da ingestão diária recomendada (RDA) de acordo com a equação 1:

$$\text{Contribuição (\%)} = \frac{5 \times ([\text{Elemento}]_{\text{Bioacessível}} + [\text{Elemento}]_{\text{Biodisponível}})}{\text{Elemento}_{\text{RDA}}} \quad (1)$$

4.6 Fator de retenção (%)

O fator de retenção (%) foi utilizado para avaliar o efeito do processo de cozimento do feijão na concentração total de Fe e Zn. Esse parâmetro indica possível contaminação ou lixiviação do elemento durante o processo de cozimento (Murphy *et al.*, 1975). Para o cálculo do fator de retenção foi utilizado a equação 2:

$$\text{Retenção (\%)} = \left(\frac{[\text{Elemento}]_{\text{cozido}}}{[\text{Elemento}]_{\text{cru}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

4.7 Instrumentação

Um ICP-MS Agilent 7900 quadrupolo (Hachioji, TY, Japão) foi usado para determinar a concentração total, bioacessível e biodisponível de Fe e Zn. As análises foram realizadas no modo cela de colisão com o fluxo de He 5 L min⁻¹ para remover possíveis interferências isobáricas causadas por íons poliatômicos (ex. ⁴⁰Ar¹⁶O⁺ e ³⁴S¹⁶O₂⁺). Para diminuir efeitos de matriz foi utilizado o padrão interno Ge (m/z 72) e a quantificação foi realizada combinando as soluções do padrão de calibração dos elementos à matriz da fração bioacessível (solução gastrointestinal), biodisponível (tampão NaHCO₃ pH 7,4) e total (solução de HNO₃ diluído 1:15).

O instrumento foi equipado com cone de amostragem e *skimmer* de níquel, um sistema de introdução da amostra composto por nebulizador Mira Mist® concêntrico e câmara de nebulização duplo passo Scott. A vazão da amostra foi de aproximadamente 300 µL min⁻¹. Os fluxos de gás, potência de radiofrequência e voltagem das lentes foram otimizadas diariamente para alcançar maior razão sinal/ruído, menor nível de óxido e íons com dupla carga. Mais detalhes sobre as condições de operação do ICP-MS são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Condições operacionais do ICP-MS para determinação quantitativa dos metais.

Parâmetros instrumentais	
Potência de radiofrequência (W)	1550
Amostragem de tocha (mm)	10,0
Fluxo de gás principal (L min ⁻¹)	15
Fluxo de gás de nebulização (L min ⁻¹)	1,0
Fluxo de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,2
Velocidade da bomba peristáltica (rps)	0,10
Medidas	
Tempo de permanência (ms)	100
Replicatas	3
Isótopos monitorados	⁵⁶ Fe ⁺ e ⁶⁶ Zn ⁺

4.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os testes t pareado foram aplicados com níveis de confiança de 95 e 99,5%. Já ANOVA e teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) foram aplicados para comparar os valores médios. Os coeficientes de Pearson (r) foram estimados para avaliar a correlação entre a concentração total, bioacessível e biodisponível de Fe e Zn. Os testes estatísticos foram realizados no software PAST (versão 4.03).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Exatidão e detectabilidade do método de quantificação

A avaliação da exatidão do método foi realizada comparando-se as concentrações dos minerais encontrada com as informações descritas no material certificado (ver Tabela 2). A concentração de Fe e Zn na farinha de arroz 1568b usando ICP-MS foi de $5,95 \pm 0,19$ e $16,31 \pm 1,17$ mg kg⁻¹, respectivamente, enquanto os valores certificados são $7,42 \pm 0,44$ e $19,42 \pm 0,26$ mg kg⁻¹.

Considerando os valores médios encontrados e aplicando o teste t pareado, a diferença entre os valores encontrados e certificados não é significativa considerando o nível de confiança de 98% ($t_{\text{crítico}} = 6,97$, N = 3) para Zn e 99,5% ($t_{\text{crítico}} = 14,09$, N = 3) para Fe. Esses resultados indicam que o método apresenta exatidão adequada utilizando o material certificado como matriz compatível devido à indisponibilidade de materiais de referência certificados semelhantes a amostra em estudo. Essa estratégia tem mostrado sucesso para outras matrizes vegetais como girassol (Júnior *et al.*, 2016) e polpa de açaí (Oliveira *et al.*, 2019).

Tabela 2: Determinação das concentrações dos metais presentes no material certificado (desvio padrão dos valores médios, n=3) por ICP-MS com adição de padrão interno

Elemento	Concentração em mg kg ⁻¹		Teste-t pareado	C.V. (%)	LOD*	LOQ*	Rec (%)
	Certificado	Encontrado					
Fe	$7,42 \pm 0,44$	$5,95 \pm 0,19$	-13,40	3,25	0,11	0,38	80,18
Zn	$19,42 \pm 0,26$	$16,31 \pm 1,17$	-4,60	7,17	0,27	0,90	83,99

*LOD e LOQ em µg kg⁻¹

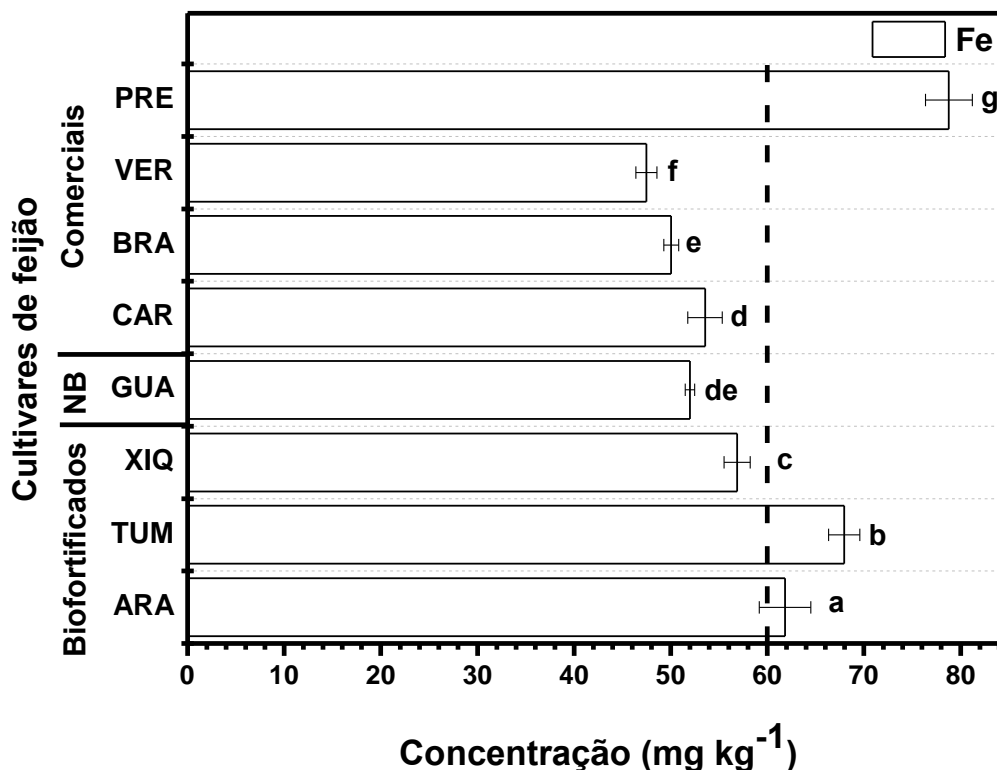
Além disso, a precisão foi menor que 7,20% para medições destes micronutrientes no material de referência. A recuperação foi maior que 80% para ambos os elementos medidos. Segundo RIZZETTI *et al.*, (2016) são aceitáveis valores de recuperação entre 70 e 120%. O método também apresentou alta detectabilidade cujos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram 0,11 e 0,38 µg kg⁻¹ e 0,27 e 0,90 µg kg⁻¹, para Fe e Zn, respectivamente. O resultado satisfatório do método de quantificação de Fe e Zn também está associado à aplicação da estratégia matricial combinada e ao uso de um padrão interno (⁷²Ge) que auxiliam na redução de erros aleatórios e sistemáticos associados a variações nos

parametros instrumentais (SKOOG, 2009). Na verdade, essas estratégias minimizam o efeito da matriz e as flutuações no plasma na formação dos íons analitos.

5.2 Concentração total de micronutrientes Fe e Zn em cultivares de feijão-caupi

A Figura 1 e 2 mostra a concentração total de ferro e zinco encontrada nas sementes de cultivares de feijão-caupi e feijão comerciais. Conforme esperado, as concentrações de ferro (ver Figura 1) nas cultivares de feijão-caupi biofortificado Aracê ($61,8 \text{ mg kg}^{-1}$) e Tumucumaque ($68,0 \text{ mg kg}^{-1}$) foram superiores a 60 mg kg^{-1} , exceto para a cultivar biofortificada Xiquexique ($56,9 \text{ mg kg}^{-1}$). Comportamento semelhante foi observado por (PEREIRA; TAVANO, 2014), que encontraram uma concentração total de ferro em sementes da cultivar Xiquexique de 51 mg kg^{-1} .

Figura 1: Concentração total (mg kg^{-1}) de ferro em feijão comercial, em sementes cruas de cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



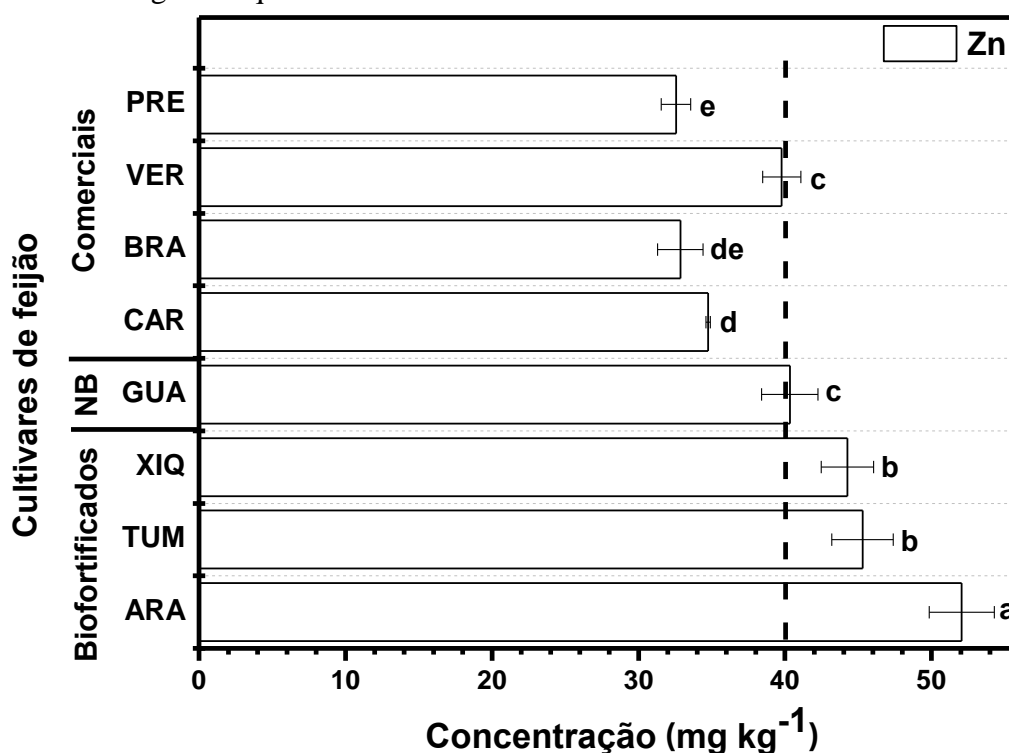
Considerando as cultivares de feijão comercial, apenas o feijão Preto apresentou concentração de ferro superior a 60 mg kg^{-1} (linha tracejada na Figura 1A) e das cultivares de feijão-caupi biofortificadas. Já as demais cultivares comerciais apresentaram concentração de ferro inferior ao valor das cultivares biofortificadas. A literatura reporta que as concentrações

de ferro no feijão comercial variam de 48 a 92 mg kg⁻¹ (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

Em análise em dezesseis cultivares de feijão-caupi, incluindo a cultivar Tumucumaque DIAS-BARBOSA *et al.*, (2020) obtiveram média de concentração de ferro variando de 47 mg kg⁻¹ a 73 mg kg⁻¹, com média geral de 5,59 mg 100g⁻¹, sendo que a cultivar Tumucumaque apresentou concentração de ferro de 64 ± 2 mg kg⁻¹. Com isso a variação encontrada no presente estudo foi menor e dentro da variação relatada por DIAS-BARBOSA *et al.*, (2020), e ainda a concentração encontrada para a cultivar biofortificada Tumucumaque foi inferior a relatada neste trabalho (67,96 ± 1,60 mg kg⁻¹).

Embora não biofortificada, a cultivar Guariba apresentou concentração de ferro total semelhante as cultivares comerciais Branco e Carioca pelo teste de Tukey (p <0,05). Esses resultados revelam que a cultivar não biofortificada Guariba também é uma alternativa viável para o cultivo comercial como fonte deste micronutriente. Para o zinco, como pode ser visto na Figura 2, as cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado apresentaram uma concentração total de zinco superior a 40 mg kg⁻¹ (demarcado pela linha tracejada).

Figura 2: Concentração total (mg kg⁻¹) de zinco em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



A cultivar biofortificada Aracê apresentou o maior concentração de zinco (52 mg kg^{-1}). Em contraste, o valor para ser considerada uma cultivar rica em zinco (40 mg kg^{-1}) foi alcançado apenas pela cultivar comercial Verde entre as variedades de feijão comercial estudadas, já as cultivares comerciais Preto, Carioca e Branco foram as que apresentaram as menores concentrações de zinco total. De fato, foi observado que a concentração de zinco nas sementes de cultivares de feijão-caupi é superior ao do feijão comercial.

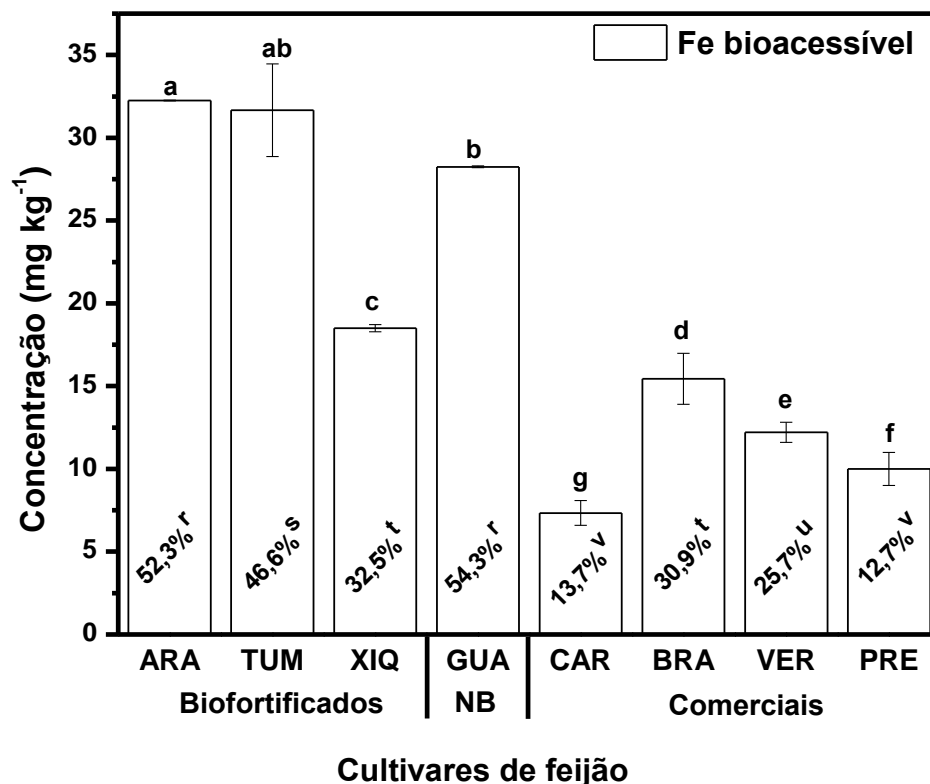
Em um estudo recente desenvolvido por GERRANO *et al.*, (2019) envolvendo uma ampla diversidade genética de feijão-caupi, a concentração de zinco determinado em 22 cultivares de leguminosas variou entre 33 e 51 mg kg^{-1} , enquanto a concentração de zinco encontrada em genótipos convencionais e melhorados geneticamente de *Phaseolus vulgaris* L. estava na faixa de 25 para 38 mg kg^{-1} (GIUBERTI *et al.*, 2019; PACHÓN *et al.*, 2009). Já com relação a cultivar biofortificada Tumucumaque, a concentração total de zinco foi estatisticamente semelhante ($4,47 \pm 0,05 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) ao relatado por DIAS-BARBOSA *et al.*, (2020).

Essas novas descobertas para a concentração total de ferro e zinco em sementes de cultivares de feijão-caupi revelam que o protocolo de biofortificação da cultura utilizado pela Embrapa Meio-Norte é compatível com o escopo nutricional. Por exemplo, a cultivar Aracê biofortificada apresentou alta concentração de ferro e zinco, enquanto a cultivar de feijão Preto comercial era rica apenas em ferro. Os resultados também indicam que o feijão-caupi é uma alternativa nutritiva, acessível e sustentável para grupos vulneráveis no combate à desnutrição. Embora não biofortificada, a cultivar Guariba possui sementes ricas em zinco e com concentração de ferro semelhante ao do feijão comercial.

5.3 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de Fe em sementes de feijão

A biofortificação da cultura deve garantir o aumento da concentração de nutrientes e da biodisponibilidade (FIGUEIREDO *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016). Embora sejam normalmente consumidos cozidos, as sementes de feijão secas são utilizadas na preparação de alguns pratos da culinária americana e africana (PHILLIPS, 2013). Portanto, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de ferro e zinco foram avaliadas em sementes de feijão comercial, feijão-caupi biofortificadas e não biofortificadas na forma crua. As Figuras 3 e 4 mostram as concentrações e frações de ferro bioacessíveis e biodisponíveis das sementes crua.

Figura 3: Concentração de ferro bioacessível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no topo das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.

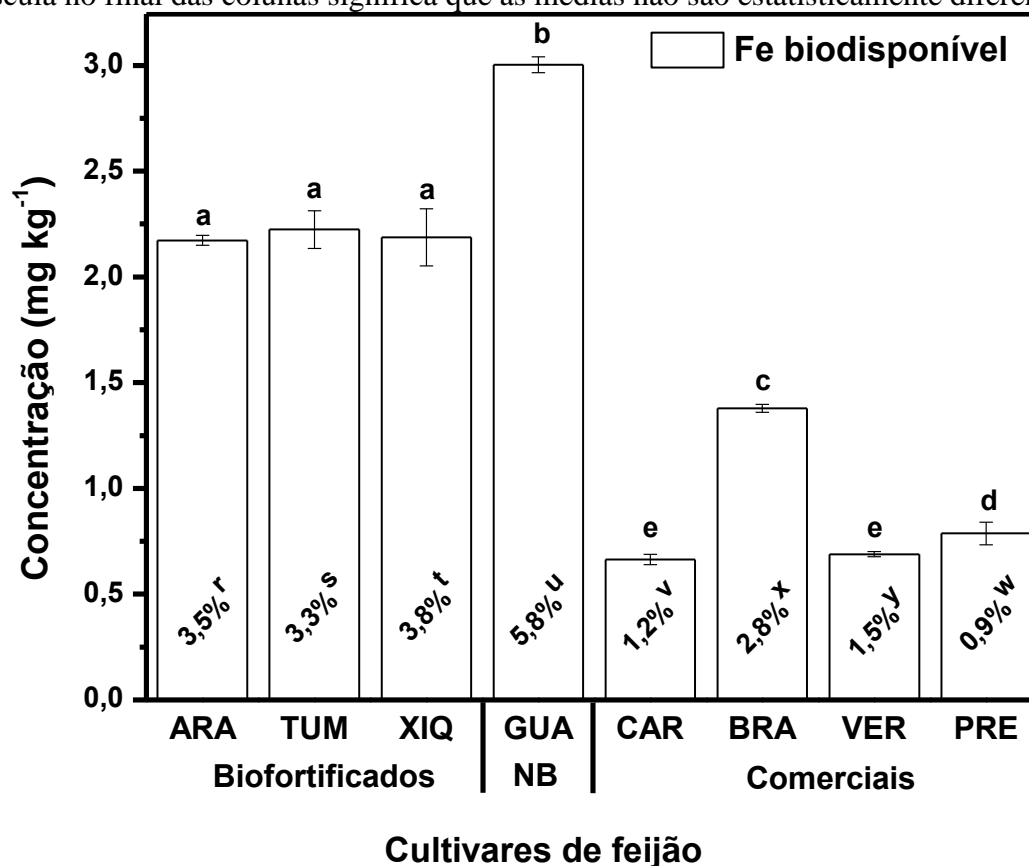


A concentração de ferro bioacessível (Figura 3) está na faixa de 18,5 - 32,3 e 7,3 - 15,4 mg kg^{-1} para feijão-caupi e feijão comercial, respectivamente. As cultivares biofortificadas Aracê e Tumucumaque apresentaram a maior concentração, já as cultivares comerciais Carioca e Preto ficaram com as menores concentrações de ferro bioacessível. Considerando o valor médio, a concentração de ferro bioacessível encontrada nas cultivares de feijão-caupi é *ca.* 2,5 vezes maior do que no feijão comercial, com todas as cultivares de feijão-caupi apresentando maior concentração de ferro bioacessível em relação as sementes comerciais.

Em termos percentuais, a fração bioacessível de ferro em sementes de cultivares de feijão-caupi e da cultivar comercial Branco foi superior a 30%. Como pode ser visto na Figura 3, a cultivar biofortificada Aracê apresentou uma fração de ferro bioacessível de 52,3%. A cultivar não biofortificada Guariba também deve ser destacada pois a bioacessibilidade do ferro foi *ca.* 54%. As cultivares de feijão-caupi fornecem mais ferro bioacessível que as cultivares comerciais, assim esses resultados demonstram que o processo de biofortificação foi eficaz em aumentar a concentração e a bioacessibilidade de ferro em

sementes de cultivares de feijão-caupi. Considerando a biodisponibilidade do ferro (Figura 4), a concentração encontrada nas sementes das cultivares de feijão-caupi foi superior e significativamente diferente do feijão comercial pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 4: Concentração de ferro biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



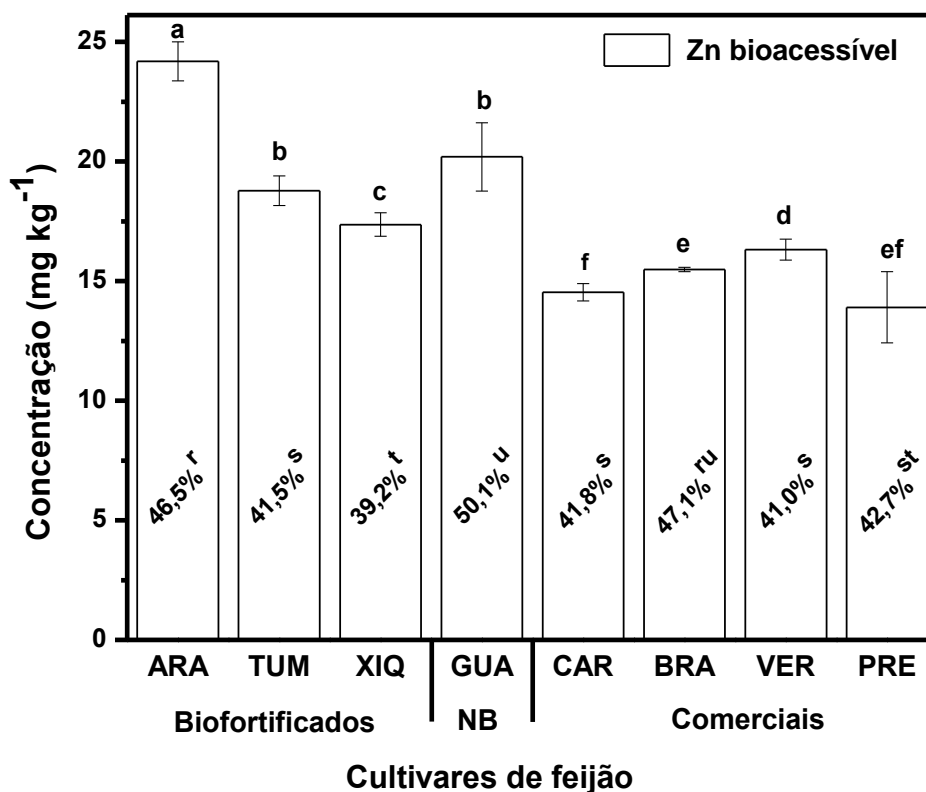
As cultivares Aracê e Tumcumaque, ricas em ferro, apresentaram também concentrações de ferro biodisponíveis superiores a das cultivares comerciais. Com isso o aumento na concentração de ferro nas cultivares de feijão-caupi possibilita uma maior quantidade de ferro disponível. A fração de ferro biodisponível em sementes de cultivar de feijão-caupi é *ca.* 2,6 vezes maior do que no feijão comercial. As cultivares de feijão-caupi biofortificado apresentaram uma fração de ferro biodisponível superior a 3,0%, e a cultivar Guariba não biofortificada apresentou um percentual de *ca.* 5,8%. Por outro lado, os cultivares comerciais exibiram percentual de ferro biodisponível inferior ao encontrado nas cultivares de feijão-caupi com valores que variaram de 0,9% (Preto) a 2,8% (Branco). Considerando que as cultivares comerciais são feijões comuns (*Phaseolus vulgaris* L.), esses

resultados eram esperados, uma vez que a biodisponibilidade do ferro nesses feijões é baixa, na faixa de 1 a 2% para humanos (LAPARRA; GLAHN; MILLER, 2008).

5.4 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de Zn em sementes de feijão

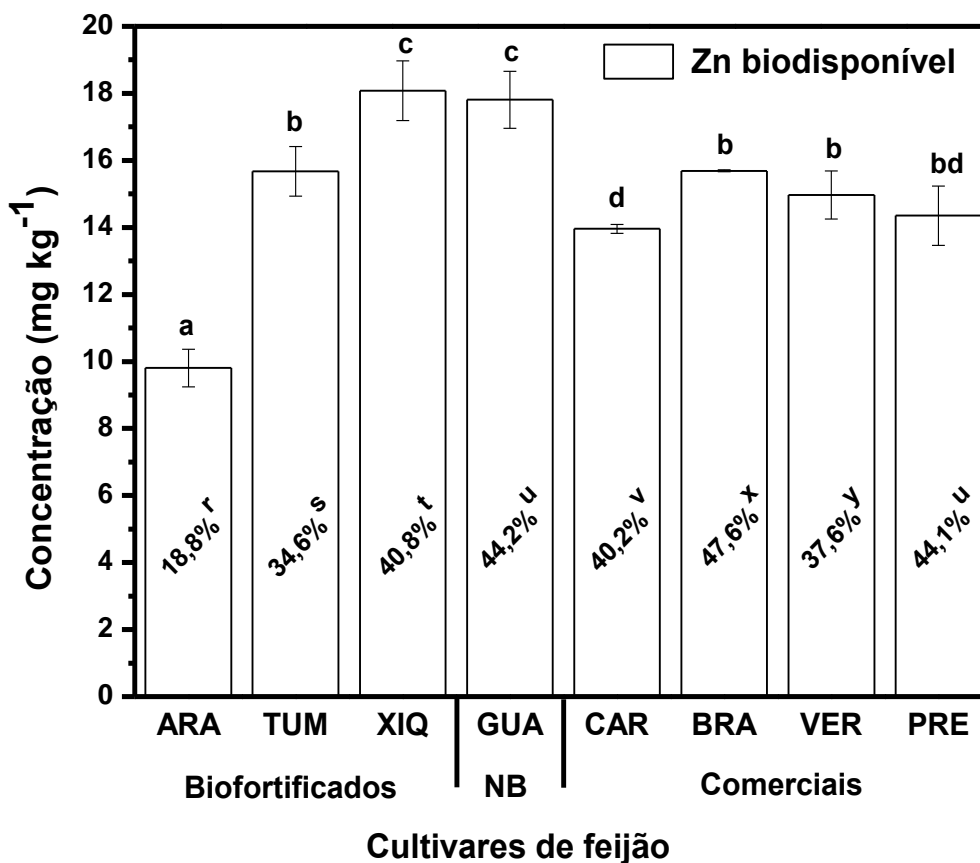
A concentração de zinco bioacessível, como visto na Figura 5, foi *ca.* 25% maior em sementes de cultivares de feijão-caupi em relação ao feijão comercial. A cultivar biofortificada Aracê apresentou o maior (24 mg kg⁻¹), já as cultivares comerciais Carioca e Preto as menores concentrações de zinco bioacessível.

Figura 5: Concentração de zinco bioacessível (mg kg⁻¹) e fração (%) em sementes cruas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



A fração de zinco bioacessível estava na faixa de 39-50% e 41-47% para feijão-caupi e comerciais, respectivamente. Em termos percentuais, a maior bioacessibilidade para o zinco foi encontrada nas cultivares não biofortificada Guariba (50,1%) e comercial Branco (47,1%). Com isso, ao contrário do observado para o ferro, houve um efeito menos pronunciado da biofortificação na bioacessibilidade do zinco. Considerando a biodisponibilidade do zinco (Figura 6), a concentração nas cultivares de feijão-caupi biofortificada Xiquexique e não biofortificada Guariba foram as maiores entre as sementes analisadas.

Figura 6: Concentração de zinco biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cruas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado (NB). Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



Em média, comparando-se as cultivares de feijão-caupi e feijão comercial, não houve diferença estatística entre as frações biodisponíveis de zinco. Se todas as amostras tivessem a mesma quantidade total de zinco, a cultivar comercial Branco seria a que mais biodisponibilizaria este micronutriente. Comparando com resultados encontrados na literatura, a fração biodisponível de zinco encontrada em cultivares de feijão-caupi é semelhante aos valores relatados, para cultivares semelhantes, por PEREIRA *et al.*, (2016), exceto para as cultivares biofortificada Aracê (38,62%) e não biofortificada Guariba (40,82%).

Comparando a biodisponibilidade do zinco, os cultivares de feijão-caupi biofortificados foram elevados atingindo *ca.* 41%, valor superior a outras culturas alimentares típicas, por exemplo, arroz (21%) e milho (7,8%) (HEMALATHA; PLATEL; SRINIVASAN, 2007), girassol (13%) (JÚNIOR *et al.*, 2016), alface (1,2%) (SILVA; CADORE, 2019) e ainda nozes de macadâmia (23%), nozes cruas (26%) e pistache torrado (9,6%) (MOREDA *et al.*, 2016).

Comparando as Figuras 4 e 6, a biodisponibilidade do zinco também é muito maior do que a do ferro. MEYER *et al.*, (2013) também avaliaram a biodisponibilidade de micronutrientes e descobriram que a fração biodisponível do ferro foi 3,1 vezes menor do que a do zinco para o feijão comum cultivado na Nicarágua. Esses resultados demonstram que os cultivares de feijão-caupi biofortificados têm alta concentração de micronutrientes e podem ser usados para reverter a deficiência de ferro e zinco em populações de todo o mundo.

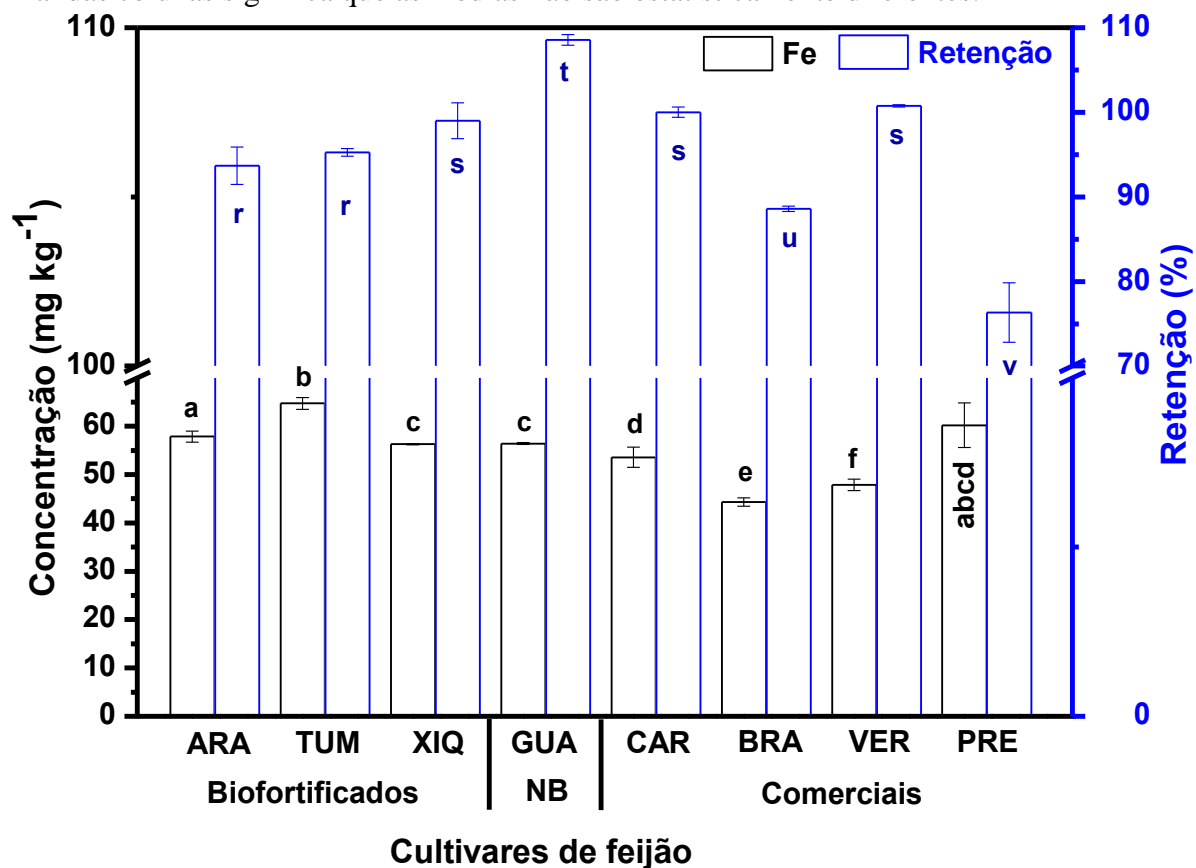
5.5 Efeito do cozimento na concentração total de ferro e zinco em feijão

O feijão é tipicamente consumido cozido e a maioria das sementes de leguminosas são “difíceis de cozinhar” (PHILLIPS, 2013). Alguns métodos relatados para o cozimento do feijão são com ou sem pressão e com ou sem imersão prévia dos grãos em água. Recentemente, PEREIRA *et al.*, (2016) avaliaram diferentes processos de cozimento e constataram que a bioacessibilidade de ferro e zinco é maior em grãos de feijão cozidos diretamente em panelas de pressão domésticas. Considerando a simplicidade, a rapidez e a eficiência, realizou-se o mesmo procedimento com pequenas modificações.

A Figura 7 mostra a concentração total de ferro nas sementes cozidas de cultivares de feijão-caupi e feijão comercial. O efeito do processo de cozimento sobre a concentração de micronutrientes nos grãos foi avaliado por meio do fator de retenção que considera a razão entre a concentração de micronutrientes nos grãos cozidos e crus (PEREIRA; TAVANO, 2014).

Como pode ser visto na Figura 7, apenas a cultivar comercial Preto e a cultivar de feijão-caupi biofortificada Tumucumaque manteve-se ricas em ferro. O fator de retenção de ferro ficou na faixa de 94 – 109% e 76 – 101% para feijão-caupi e feijão comercial, respectivamente. Também para um sistema de cozimento sob pressão, PEREIRA *et al.*, (2014) encontraram um fator de retenção de ferro para cultivares de feijão-caupi na faixa de 95% a 100%. Embora os resultados sejam esperados para um sistema de cozimento fechado, a retenção de ferro foi menor para as cultivares comerciais Preto (76%) e Branco (89%), o que pode ser atribuído à leve lixiviação, pois após o cozimento, apesar do caldo ter sido liofilizado junto, era coletado apenas as sementes para as etapas seguintes.

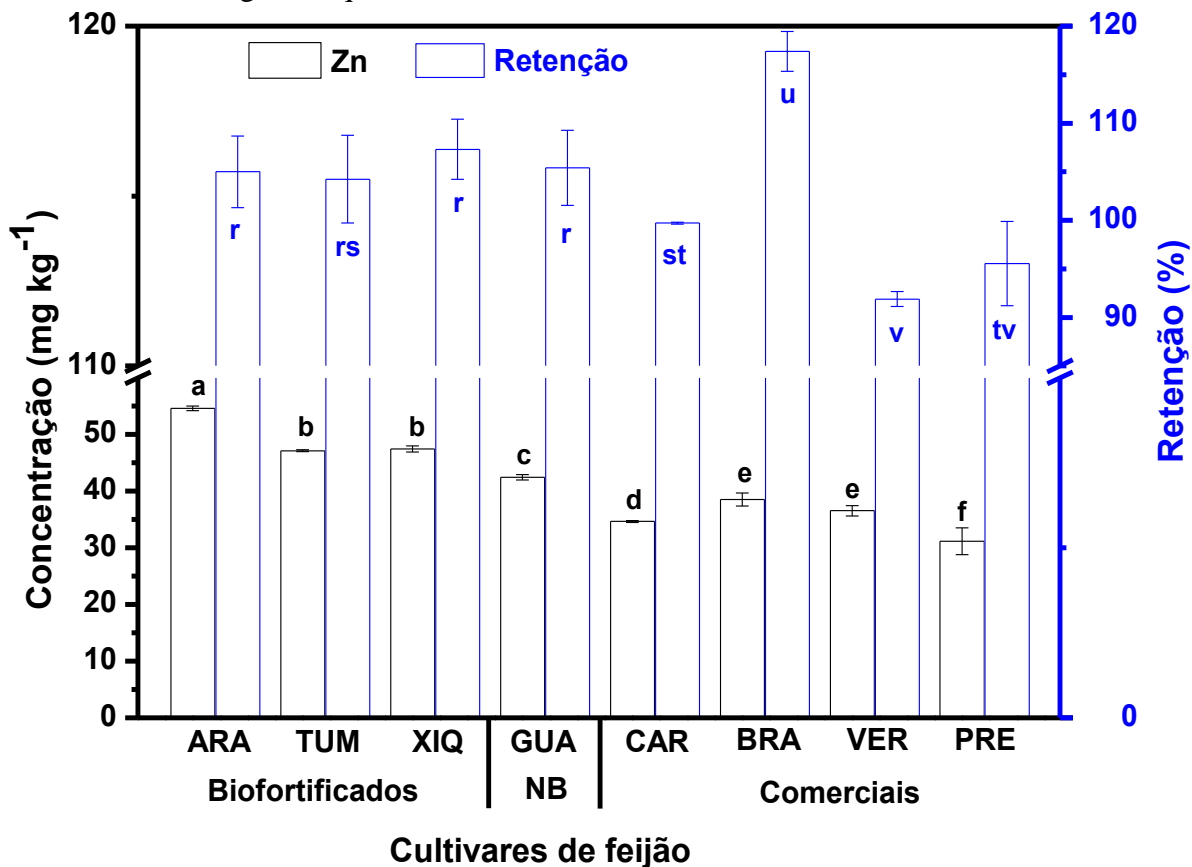
Figura 7: Concentração total (mg kg^{-1}) e fator de retenção de ferro em sementes cozidas de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



Entre as cultivares comercial Preto e biofortificada Tumucumaque e Aracê que apresentaram as maiores concentrações de ferro na forma crua, todos apresentaram diminuição após o cozimento, porém a maior foi apresentada pelo feijão comercial Preto. Recentemente, WIESINGER *et al.*, (2018) encontraram fatores de retenção para alguns genótipos de feijão comum variando de 71% a 83% aplicando o método de cozimento sob pressão com imersão prévia do feijão em água.

Para o fator de retenção de zinco (ver Figura 8), os valores para cultivares de feijão-caupi variaram de 104 a 107% enquanto os encontrados para cultivares de feijão comercial ficaram na faixa de 92 – 117%. Assim para as cultivares de feijão-caupi não houve redução na concentração de zinco após o cozimento. Cultivares de feijão-caupi já apresentaram um percentual de retenção de zinco variando entre 89,4% e 98,2% (PEREIRA *et al.*, 2014).

Figura 8: Concentração total (mg kg^{-1}) e fator de retenção de zinco em sementes cozidas de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



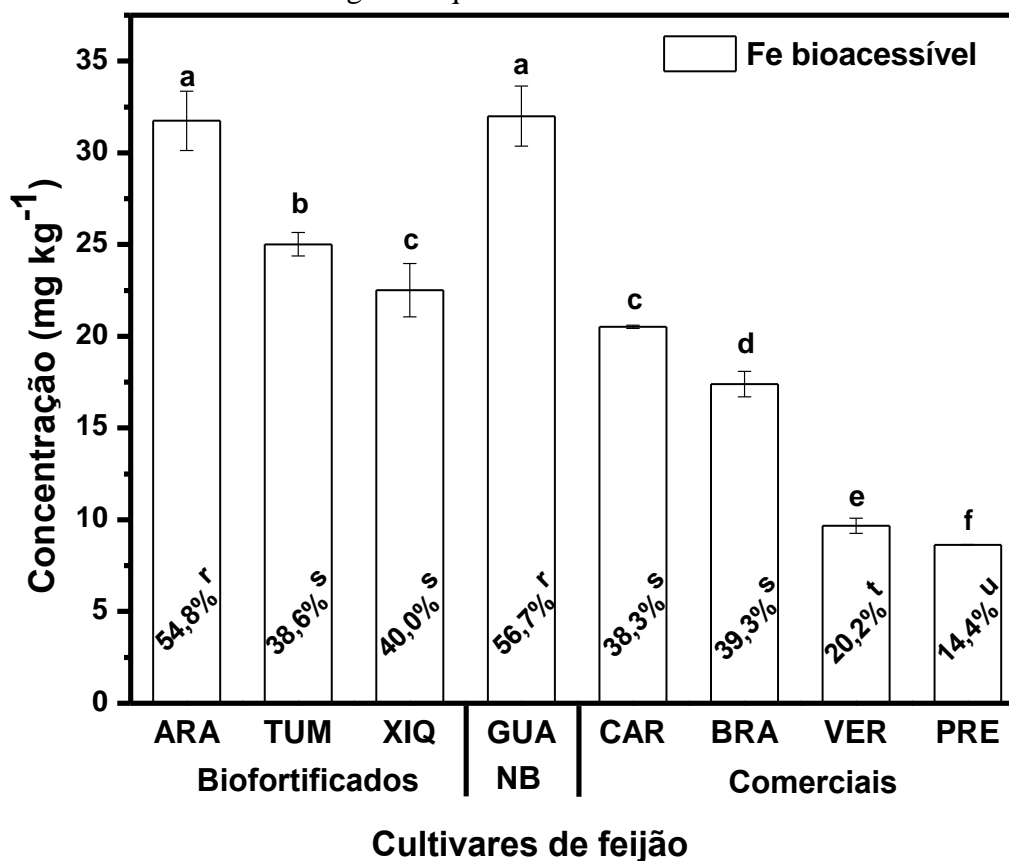
O alto valor obtido para a cultivar comercial Branco ($117 \pm 2\%$) pode estar associado à sua contaminação devido à migração de íons zinco da superfície do pote para os grãos (FEITOSA *et al.*, 2018). De fato, a manutenção da concentração de micronutrientes em cultivares de feijão-caupi é assegurada quando cozida por um método normalmente aplicado.

5.6 Efeito do cozimento na concentração bioacessível e biodisponível de ferro em feijão

Além dos compostos presentes na matriz vegetal, o método de processamento também interfere na bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro e zinco em leguminosas como o feijão (FEITOSA *et al.*, 2018; PHILLIPS, 2013; WIESINGER *et al.*, 2018). Embora os alimentos cozidos tenham demonstrado diferentes qualidades nutricionais, o cozimento inativa compostos antinutricionais e promove a liberação de micronutrientes de compostos proteicos melhorando sua absorção no trato gastrointestinal (FABBRI; CROSBY, 2016; FEITOSA *et al.*, 2018).

A Figura 9 mostra as concentrações de ferro bioacessível em sementes cozidas de cultivares de feijão-caupi e feijão comercial. As cultivares biofortificada Aracê e não biofortificada Guariba apresentaram as maiores concentrações de ferro bioacessível, e a cultivar comercial Preto a menor concentração desse micronutriente. As cultivares de feijão-caupi apresentaram maior concentração de ferro bioacessível do que as cultivares de feijão comercial e a diferença é significativa de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 9: Concentração de ferro bioacessível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.

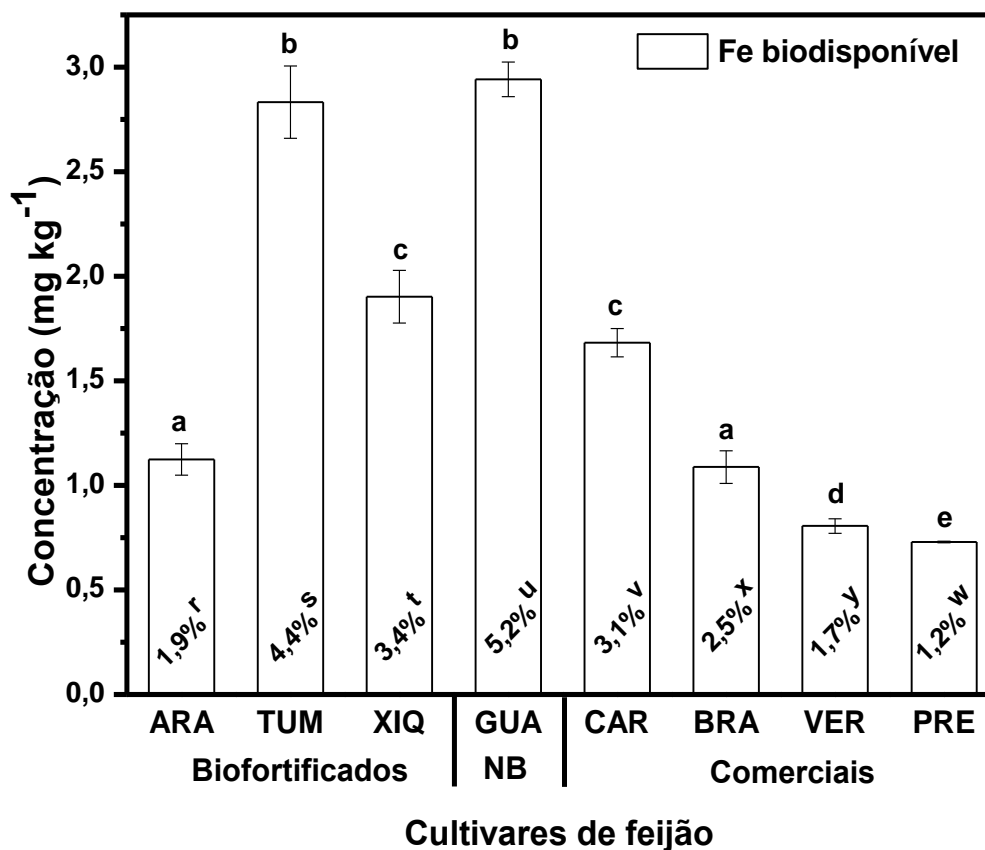


A fração bioacessível de ferro nas sementes de feijão-caupi cozido foi superior a 38% enquanto para o feijão comercial apenas as cultivares comerciais Branco e Carioca atingiram valores semelhantes. O alto percentual de ferro bioacessível apresentado pelas cultivares biofortificada Aracê (54,8%) e não biofortificada Guariba (56,7%) indicam que a biofortificação e/ou melhoramento genético promovem aumento da bioacessibilidade do nutriente nas sementes desta leguminosa. A cultivar comercial Verde e biofortificada Tumucumaque apresentaram frações inferiores ao encontrado nas amostras cruas. Já as cultivares comerciais Carioca, Branco e biofortificada Xiquexique aumentaram

significativamente a bioacessibilidade do ferro de 14 para 38%, 31 para 39% e 33 para 39%, respectivamente.

Como pode ser visto na Figura 10, a concentração de ferro biodisponível apresentou comportamento semelhante à forma crua onde os maiores valores foram encontrados para as cultivares de feijão-caupi quando comparados ao feijão comercial. As cultivares biofortificada Tumucumaque e não biofortificada Guariba apresentaram alto percentual de ferro biodisponível, 4,4% e 5,2%, respectivamente, enquanto o valor mais alto nas amostras comerciais foi encontrado na cultivar comercial Carioca.

Figura 10: Concentração de ferro biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



O método de cozimento aumentou a concentração de ferro biodisponível em *ca.* 1,3, 2,6, 1,1 e 1,3 vezes nas cultivares biofortificada Tumucumaque e comerciais Carioca, Verde e Preto, respectivamente, com destaque para a cultivar comercial Carioca que passou de 1,2% para 3,1%. O cozimento pode ter reduzido a concentração de antinutrientes (por exemplo,

polifenóis totais e taninos condensados) como observado para o feijão preto cozido sob pressão, como demonstrado por FEITOSA *et al.*, (2018).

Ao contrário, a fração biodisponível de ferro em sementes cozidas da cultivar biofortificada Aracê foi de *ca.* 46% inferior ao valor verificado para grãos crus. Esse resultado pode ser atribuído ao alta concentração de polifenóis totais e flavonoides presentes nas sementes cruas e cozidas da cultivar biofortificada Aracê, considerando que este cultivar é o único feijão-caupi analisado que apresenta coloração verde (BARROS *et al.*, 2017). O tratamento térmico promove um efeito sinérgico entre os polifenóis e o ferro, reduzindo a solubilidade dos compostos e, conseqüentemente, a disponibilidade do micronutriente para absorção no teste de digestão *in vitro* aplicado.

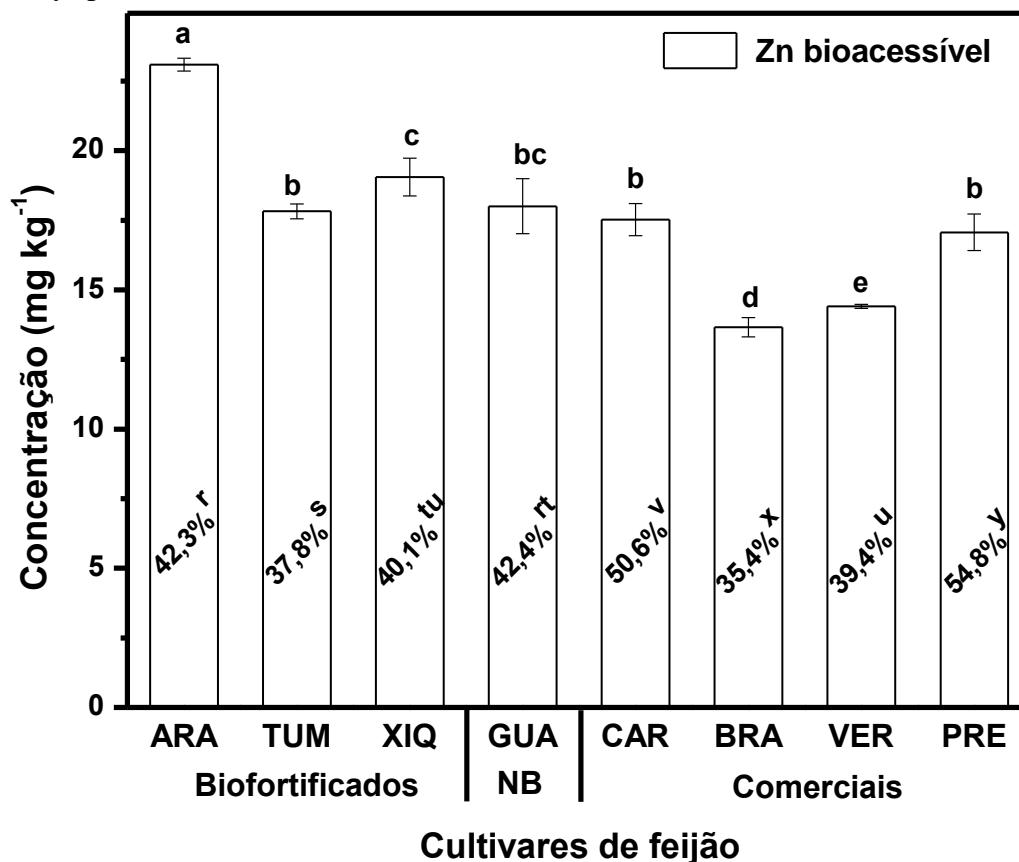
5.7 Efeito do cozimento na concentração bioacessível e biodisponível de zinco em feijão

Como visto na Figura 11, a concentração de zinco bioacessível em sementes de cultivares de feijão-caupi foi em média *ca.* 20% maior em relação ao feijão comercial. A cultivar biofortificada Aracê apresentou a maior concentração (23 mg kg⁻¹) e a cultivar comercial Branco a menor concentração (14 mg kg⁻¹) de zinco bioacessível, sendo os valores significativamente diferente das demais de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Em termos percentuais, os valores de bioacessibilidade para zinco em sementes de cultivares de feijão-caupi variaram de 38% (Tumucumaque) a 42% (Guariba) enquanto para as cultivares comerciais ficaram na faixa de 35% (Branco) a 55% (Preto).

Considerando as frações das cultivares biofortificada Tumucumaque (38%) e comercial Verde (39%) que possuem percentuais bem próximos, a ingestão da cultivar biofortificada Tumucumaque fornece uma maior quantidade de zinco do que a cultivar comercial Verde, pois para cada quilo da cultivar biofortificada Tumucumaque temos aproximadamente 47 mg de zinco, destes 18 mg são bioacessíveis, já para a cultivar comercial Verde, com a mesma massa de feijão, apenas 15 mg ficam bioacessíveis após a digestão *in vitro*.

Ressalta-se que a análise dos percentuais auxilia na avaliação da influência de compostos que podem inibir ou facilitar a bioacessibilidade destes elementos. O cozimento interfere levemente na bioacessibilidade do zinco em sementes de feijão-caupi. No entanto, feijão Preto cozido apresentou *ca.* aumento na fração bioacessível em relação à forma crua.

Figura 11: Concentração de zinco bioacessível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão comercial, cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. A mesma letra minúscula no topo das colunas representa médias estatisticamente semelhantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

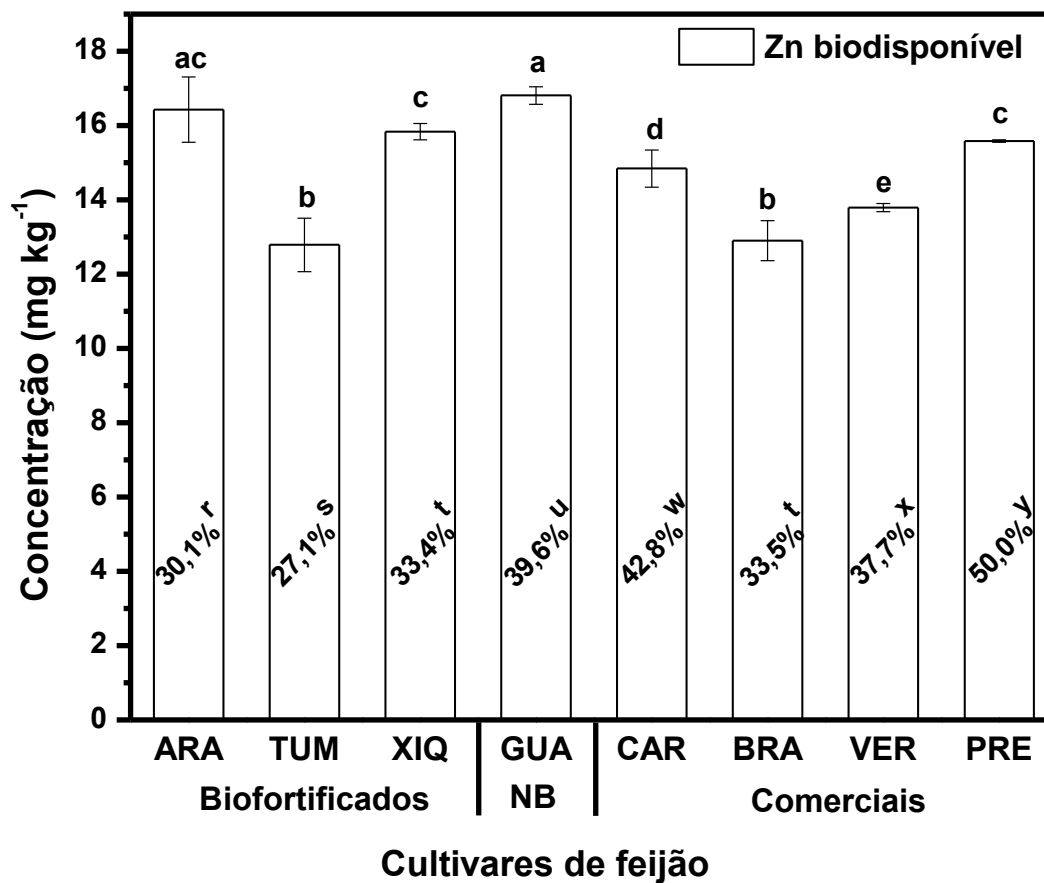


Considerando a biodisponibilidade do zinco (Figura 12), as cultivares biofortificadas Aracê e não biofortificada Guariba apresentaram os maiores valores, significativamente diferentes dos feijões comerciais, exceto do comercial Preto, e da cultivar biofortificada Tumucumaque pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O processamento térmico promoveu um *ca.* aumento de 60% na biodisponibilidade de zinco na cultivar biofortificada Aracê, única cultivar de feijão-caupi que apresentou aumento no percentual biodisponível de zinco. A cultivar comercial Branco reduziu em 30% a fração biodisponível de zinco após o cozimento, maior diminuição entre todos os feijões analisados.

A absorção de zinco também aumentou ligeiramente nas cultivares comerciais cozidas de feijão Carioca (6,6%), Verde (0,3%) e Preto (14,1%). Esse fato pode estar associado ao efeito do cozimento na liberação de zinco a partir de complexos com antinutrientes, principalmente fitatos (RAES *et al.*, 2014), bem como pela desnaturação de proteínas

(HEMALATHA; PLATEL; SRINIVASAN, 2007; SHI *et al.*, 2017). Os resultados comprovam a influência do cozimento na bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro e zinco em sementes de leguminosas.

Figura 12: Concentração de zinco biodisponível (mg kg^{-1}) e fração (%) em sementes cozidas de feijão-comercial, cultivares de feijão-caupi, biofortificado e não biofortificado. Mesma letra minúscula no final das colunas significa que as médias não são estatisticamente diferentes.



O efeito observado foi positivo para a maioria das cultivares de feijão-caupi, promovendo uma melhora na qualidade nutricional das sementes das novas cultivares na forma tipicamente consumida na dieta humana. De fato, estudos relatados na literatura demonstram o efeito do cozimento na redução dos fatores antinutricionais e na melhora da atividade dos promotores de absorção de micronutrientes em matrizes alimentares vegetais (FABBRI; CROSBY, 2016; RAES *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2017).

5.8 Predição da contribuição do consumo de feijão-caupi na ingestão diária de Fe e Zn

Mais de dois bilhões de pessoas no mundo sofrem de deficiência de micronutrientes (fome oculta) (HUERTAS *et al.*, 2022). A desnutrição de micronutrientes é bastante prevalente em países em desenvolvimento devido a uma dieta restrita com baixo consumo de carne e predominância de vegetais e leguminosas ricos em inibidores de ferro e zinco (SINGH *et al.*, 2016). A biofortificação de culturas básicas tem demonstrado eficácia, sustentabilidade e viabilidade a curto prazo para reduzir a prevalência de deficiência de ferro e zinco, pois é segura, fácil de regular e tem ampla aceitabilidade social (HOPPLER *et al.*, 2014). Com relação ao consumo, segundo o IBGE, (2020), o feijão é consumido por 60% da população adulta no Brasil com média de 142,2 g dia⁻¹, sendo o Brasil, o segundo país que mais consome feijão no mundo¹.

Embora a deficiência de ferro e zinco afete todas as faixas etárias e níveis sociais, a maior prevalência está entre gestantes e crianças menores de 3 anos em países de baixa renda como o Brasil (FISBERG *et al.*, 2018). Os valores de ingestão diária recomendada (RDA) descrito pela RDC 269/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com base nas recomendações da OMS, indicam que crianças e gestantes devem ingerir 6,0 e 27,0 mg de ferro e 4,1 e 11,0 mg de zinco, respectivamente (ANVISA, 2005). A Tabela 3 mostra a contribuição do consumo de 50 g de feijão-caupi ou feijão comercial para a RDA de Fe e Zn nas faixas etárias mais vulneráveis (gestantes e crianças). Para estimar a contribuição do micronutriente RDA, foi considerada as concentrações bioacessíveis e biodisponíveis de Fe e Zn encontradas nas sementes das cultivares de feijão cozido por ser a forma mais comum de consumo de leguminosas.

Uma porção de aproximadamente 50 g de semente de feijão-caupi cozida é capaz de fornecer *ca.* Fe 2,0 vezes mais para gestantes e crianças de 1 a 3 anos quando comparado ao feijão comercial. As cultivares biofortificada Aracê e não biofortificada Guariba fornecem as maiores quantidades diárias recomendadas de Fe. A mesma porção de hortaliças comestíveis como alface (SILVA; CADORE, 2019) e polpa de açaí (OLIVEIRA *et al.*, 2019) fornece 2,00% e 2,80% de Fe para crianças de a 1 a 3 anos enquanto para gestantes contribuem apenas 0,45% e 0,35 %, respectivamente.

Considerando os valores de RDA para Zn, a contribuição do consumo de uma porção de 50 g de cultivares de feijão-caupi cozido é um pouco maior que a do feijão comercial para ambos os grupos de estudo (crianças e gestantes). A cultivar biofortificada Aracê fornece a maior contribuição para a necessidade de ingestão diária de Zn para crianças de 1 a 3 anos

(48,20%) e gestantes (17,96%), estatisticamente diferente das demais cultivares de feijão estudadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3: Porcentagem de contribuição do consumo de 50 g de cultivares de feijão cozido para ingestão diária de Fe e Zn por gestantes e crianças de 1 a 3 anos.

Cultivares	Contribuição (%)*			
	Fe		Zn	
	Crianças 1 - 3 anos	Gestantes	Crianças 1 - 3 anos	Gestantes
ARA	27,39 ± 1,41 ^a	6,09 ± 0,31 ^a	48,20 ± 1,35 ^a	17,96 ± 0,50 ^a
TUM	23,20 ± 0,68 ^b	5,16 ± 0,15 ^b	37,33 ± 1,21 ^b	13,91 ± 0,45 ^b
XIQ	20,35 ± 1,32 ^c	4,52 ± 0,29 ^c	42,55 ± 1,09 ^c	15,86 ± 0,41 ^c
GUA	29,12 ± 1,43 ^a	6,47 ± 0,32 ^a	42,46 ± 1,49 ^c	15,82 ± 0,55 ^c
CAR	18,49 ± 0,13 ^d	4,11 ± 0,03 ^d	39,47 ± 1,32 ^{bd}	14,71 ± 0,49 ^{bd}
BRA	15,41 ± 0,65 ^e	3,42 ± 0,14 ^e	32,40 ± 1,08 ^e	12,07 ± 0,40 ^e
VER	8,74 ± 0,37 ^f	1,94 ± 0,08 ^f	34,39 ± 0,22 ^e	12,82 ± 0,08 ^f
PRE	7,81 ± 0,02 ^g	1,73 ± 0,00 ^g	39,82 ± 0,84 ^d	14,84 ± 0,31 ^d

*Mesma letra minúscula na mesma coluna significa que as médias são estatisticamente semelhantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Já a cultivar comercial Branco apresentou a menor contribuição de zinco entre os feijões estudados com apenas 32,40% para crianças de 1 a 3 anos e 12,07% para gestantes. Quando a mesma porção de alface é consumida, a contribuição para o Zn RDA é de *ca.* 9 vezes menor que a de sementes de feijão-caupi cozidas para gestantes e crianças (SILVA; CADORE, 2019). A contribuição do feijão-caupi para a necessidade diária de Zn é semelhante à de alimentos de origem animal, como carne bovina cozida, que pode fornecer 40,00% e 15,00% da RDA de micronutrientes para crianças e gestantes, respectivamente (MENEZES *et al.*, 2018).

Esse resultado comprova que cultivares de feijão-caupi biofortificado e não biofortificado são ricas fontes de ferro e zinco (CARVALHO *et al.*, 2012) e possuem alto

potencial para redução dos sintomas causados pela deficiência de micronutrientes na população do Brasil e de outros países. TAKO *et al.*, (2015) demonstraram a eficácia da cultivar Carioca biofortificado para melhorar a oferta e reduzir os sintomas de desnutrição de ferro em mulheres ruandesas. Em outro estudo também com 195 mulheres de Ruanda, HAAS *et al.*, (2016) observaram aumento significativo nos níveis de ferro com base nos valores de ferritina e hemoglobina em indivíduos com deficiência e anemia após o consumo duas vezes ao dia por 128 dias da cultivar Carioca biofortificada produzido pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

5.9 Avaliação da interação Fe-Zn

Estudos sobre fisiologia e ionômica vegetal têm demonstrado uma forte correlação entre o metabolismo dos elementos ferro e zinco em vegetais (BAXTER, 2009). Além disso, a biofortificação de culturas consumíveis visa promover um aumento na concentração dos nutrientes e melhorar sua disponibilidade nas condições gastrointestinais humanas (SINGH *et al.*, 2016). Portanto, a correlação intra e interespecífica de uma cultura recentemente introduzida é necessária para avaliar o alcance dos efeitos benéficos do processo de biofortificação. Assim, avaliou-se a correlação entre a concentração total, bioacessível e biodisponível de ferro e zinco em sementes de feijão-caupi e feijão comercial. A Tabela 4 apresenta todos os valores dos coeficientes de correlação de Pearson (r) encontrados para as diferentes correlações investigadas entre Fe e Zn em feijão.

Tabela 4: Valores dos coeficientes de Pearson para a correlação entre a concentração total (T), bioacessível (A) e biodisponível (D) de ferro e zinco em sementes de diferentes cultivares de feijão.

	Fe-A	Fe-D	Fe-T	Zn-A	Zn-D	Zn-T
Fe-A	1,00					
Fe-D	0,78 ^{a*}	1,00				
Fe-T	0,18	0,16	1,00			
Zn-A	0,80 ^{b*}	0,50	0,18	1,00		
Zn-D	0,07	0,21	-0,09	-0,02	1,00	
Zn-T	0,79 ^{c*}	0,48	0,14	0,80 ^{d*}	-0,09	1,00

^ap= 0,000418949; ^bp= 0,000186666; ^cp= 0,000271432; ^dp= 0,000199361.

* Significância ao nível de 1% (p<0,01)

A correlação entre o Fe total e as frações bioacessíveis e biodisponíveis é baixa, indicando que a disponibilidade de ferro no trato gastrointestinal depende fortemente da interação com outros componentes da matriz vegetal. As sementes de leguminosas armazenam mais ferro como complexo de fitato e polifenóis de baixa absorção e uma pequena fração como ferritina (HOPPLER *et al.*, 2014).

Em contrapartida, a correlação da fração bioacessível de Fe com a fração biodisponível do mesmo elemento é significativa ($r = 0,78$, $p < 0,01$), demonstrando que as espécies bioacessíveis de Fe podem ser facilmente absorvidas no processo de digestão do feijão. A concentração total de zinco apresentou correlação significativa com sua fração bioacessível ($r = 0,80$, $p < 0,01$). O zinco está ligado a proteínas e enzimas nas sementes de feijão, e em condições gastrointestinais, é liberado devido à desnaturação e à hidrólise de espécies proteicas (FABBRI; CROSBY, 2016; RAES *et al.*, 2014).

Embora a correlação entre as concentrações totais de ferro e zinco tenha sido baixa ($r = 0,14$), os coeficientes de Pearson significativos para as espécies de micronutrientes foram positivos, sugerindo um sinergismo entre o metabolismo dos elementos nas plantas (eg feijão). O mecanismo de transporte de Fe e Zn é mediado principalmente pela proteína transportadora IRT1, bem como pela nicotinamina e ácidos orgânicos, mas a forma como são armazenados nas sementes é diferente (DALCORSO; MANARA; FURINI, 2013; HOPPLER *et al.*, 2014). Alguns genótipos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) tratados com 5 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn mostraram um leve aumento na concentração total de Fe (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Ao contrário, a relação entre a concentração total de Zn e Fe bioacessível revelou valores positivos significativos para os coeficientes de Pearson ($r = 0,79$, $p < 0,01$). A correlação entre as frações bioacessíveis de Fe e Zn também foi alta e significativa ($r = 0,80$, $p < 0,01$). Em contraste, KATUURAMU *et al.*, (2018) encontraram uma baixa correlação ($r = 0,17$) entre o zinco total e a fração bioacessível de ferro em feijão comum.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo de avaliar a qualidade nutricional de cultivares de feijão-caupi biofortificado recentemente introduzidas, considerando as concentrações totais, bioacessíveis e biodisponíveis de ferro e zinco, foi alcançado com sucesso através da combinação da técnica multielementar ICP-MS e digestão *in vitro*.

As cultivares de feijão-caupi biofortificado Aracê e Tumucumaque apresentaram elevadas concentrações de Fe e Zn, sendo ricas nesses micronutrientes. Apesar de não biofortificado, o feijão-caupi Guariba apresentou alta concentração de Zn e Fe, semelhante ao do feijão comum normalmente consumido.

As concentrações de Fe bioacessível e biodisponível em sementes de cultivares de feijão-caupi foram *ca.* 2,5 vezes ao encontrado no feijão comercial. A concentração bioacessível de Zn nas cultivares de feijão-caupi foi 1,5 vezes ao encontrado nos feijões comerciais, atingindo 50,1% (GUA) e 46,5% (ARA) de fração bioacessível. As concentrações de Fe e Zn nas sementes de feijão-caupi cozidas foram semelhantes aos valores obtidos nas amostras cruas, indicando adequada retenção de micronutrientes. Em geral, a disponibilidade de Fe e Zn foi melhorada em sementes de feijão-caupi cozida, bem como em cultivares de feijão comercial. Aqui, a correlação entre Fe e Zn foi sinérgica considerando principalmente as frações bioacessíveis dos elementos.

Os resultados comprovam a eficácia do programa de melhoramento de culturas da Embrapa, pois cultivares de feijão-caupi recentemente introduzidas apresentam elevadas concentrações e disponibilidade de Fe e Zn. As cultivares de feijão-caupi apresentam potencial para diminuir a desnutrição de micronutrientes como um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Por exemplo, o consumo de uma pequena porção (50 g) da cultivar biofortificada Aracê contribui com 27% e 48% para o Fe e Zn RDA, respectivamente, para crianças de 1 a 3 anos.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DA BIOFORTIFICAÇÃO NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E
COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM FEIJÃO COMERCIAL E FEIJÃO-
CAUPI (BIOFORTIFICADO E NÃO BIOFORTIFICADO)**

7 OBJETIVOS

7.1 Geral

Desvendar a cascata de efeitos da biofortificação com foco na disponibilidade de cobre, manganês e magnésio, a composição centesimal e os compostos fenólicos totais.

7.2 Específico

- Quantificar as concentrações totais, bioacessíveis e biodisponíveis de cobre, manganês e magnésio em feijões cru e cozido;
- Avaliar o efeito da biofortificação sobre outros nutrientes minerais nas cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado;
- Investigar os efeitos do cozimento nas cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado;
- Determinar as concentrações de umidade, cinza, lipídios, proteína, carboidrato e valor energético em feijões cru;
- Realizar a determinação dos compostos fenólicos em extrato aquoso e extrato metanólico em feijões cru;
- Aplicar ferramentas estatísticas na investigação da correlação entre as variáveis analisadas.

8 PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Reagentes, padrões e materiais

Reagentes utilizados para a determinação das concentrações totais, bioacessíveis e biodisponíveis de Cu, Mn e Mg foram os mesmos utilizados para os minerais Fe e Zn informados 4.1. Reagentes utilizados na análise da composição centesimal e metanol foram adquiridos da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil) e Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). Para análises de compostos fenólicos, o padrão de ácido gálico e o reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

8.2 Determinação da concentração total, bioacessível e biodisponível Cu, Mn e Mg

As cultivares de feijão-caupi e feijão comercial estudadas foram àquelas listada na seção 4.2. Nesta etapa do trabalho a concentração de minerais também foi quantificado nas amostras na forma crua e cozida. As sementes cruas das cultivares foram secas e pulverizadas como descrito na seção 4.3. O protocolo aplicado para determinação da concentração total de Cu, Mn e Mg nas sementes das cultivares feijões foi o mesmo da seção 4.4. A concentração bioacessível e biodisponível dos elementos foi avaliada empregando o protocolo de digestão *in vitro* descrito na seção 4.5. As condições operacionais do ICP-MS usadas para análise dos elementos são as mesmas informadas no item 4.7, com exceção do magnésio que foi realizada sem uso de padrão interno. O fator de retenção para Cu, Mn e Mg foram calculados de acordo com a equação 1 descrita na seção 4.6.

8.3 Concentração de compostos fenólicos

A extração dos fenólicos das sementes de feijão foi baseada no protocolo desenvolvido por CONTINI *et al.*, (2008) e PEREIRA; TAVANO, (2014), com pequenas modificações. Para tanto, *ca.* 0,5 g de semente de feijão moída crua foi medida, e, então, 5 mL de metanol 80% (v/v) foram adicionados. A mistura foi agitada a 210 rpm por 2 h em mesa agitadora (Quimis, Diadema, SP, Brasil) e, depois, centrifugada a 3500 rpm durante 15 min em centrífuga (Novainstruments, Piracicaba, SP, Brasil). Após a centrifugação, 1 mL do extrato foi coletado e transferido para tubos

de 15 mL para a quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT) de acordo com (MONÇÃO *et al.*, 2015). Para uma alíquota de 1,0 mL do extrato, foram adicionados 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e 5,0 mL de água deionizada.

Posteriormente, a mistura foi agitada por 1 min em um agitador de tubos tipo vortex basic k45-2810 da Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brasil) e, em seguida, 2,0 mL da solução de Na₂CO₃ 15% (m/v) foram adicionados. A mistura foi agitada novamente durante 30 s e o volume completado com água deionizada para 10 mL. Em seguida, foi incubado por 1 h sob proteção de luz a temperatura ambiente e após esse período a absorbância foi medida em 745 nm usando um espectrofotômetro Ultravioleta-visível UV-1800 (SHIMADZU, kyoto, Japão).

O mesmo procedimento foi usado para preparar a curva de calibração empregando soluções padrão de ácido gálico na faixa de 10,9 a 87,2 µg mL⁻¹. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o CFT (compostos fenólicos totais) dos extratos foi expresso em mg de ácido gálico equivalente (GAE)/g massa seca de amostra (mg GAE g⁻¹). O mesmo procedimento foi adotado usando água destilada como solvente extrator. A escolha de outro solvente extrator foi de acordo com teste qualitativos preliminares realizado no laboratório.

8.4 Composição centesimal

As concentrações de umidade, de cinzas e de gordura foram obtidos empregando métodos (AOAC, 2005). Mais detalhes do procedimento são descritos a seguir.

8.4.1 Umidade

A umidade foi determinada em base seca e realizada por meio do método de secagem em estufa a 105 °C (AOAC, 2005). Foram medidos aproximadamente 3 g da amostra (m_a) triturada e homogeneizada, em cápsula de porcelana previamente tarada (m_c). Posteriormente as cápsulas com as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C até peso constante (aproximadamente 6h), depois resfriadas em dessecador para posterior medida de massa ($m_{(c+a)}$). O percentual de umidade foi calculado usando a equação 3:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(m_a - (m_{(c+a)} - m_c))}{m_a} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

m_a = massa da amostra;

$m_{(c+a)}$ = massa da capsula com a amostra após o período de aquecimento;

m_c = massa da capsula

8.4.2 Cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração em forno mufla a 550 °C, segundo a metodologia de AOAC (2005). Massa das amostras de 2 g foram medidas, em triplicata, em cadinho previamente tarado (m_c). As amostras foram carbonizadas em forno mufla a 250°C por 2 h, posteriormente incineradas por 4 h ou até peso constante a 550 °C. Ao final, os cadinhos com amostra incinerada foram colocados em dessecador, para esfriar, por 40 min e em seguida o conjunto, cadinho e cinza, tiveram a massa medida ($m_{(c+a)}$). A determinação de cinzas (%) foi obtido pela equação 4:

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{(m_{(c+a)} - m_c)}{m_a} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

m_a = massa da amostra;

$m_{(c+a)}$ = massa da capsula com a amostra após o período de aquecimento;

m_c = massa da capsula

8.4.3 Lipídios totais

Os lipídios foram determinados em extrator intermitente de Soxhlet, utilizando-se o solvente hexano PA (AOAC, 2005). Para extração, cerca de 1 g de amostras secas e sem umidade foram medidas em triplicata, e foram colocadas em cartuchos de papel filtro e estes adicionados a 100 mL de hexano e mantidos em extração contínua por 6 h a 90 °C. Após o término da extração, os tubos com o resíduo foram transferidos para a estufa e após atingido a temperatura de 105 °C, ficou por um período de 1,5 h. Ao final,

este foi resfriado em dessecador, medido a massa e determinado os lipídios (%) pela equação 5:

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{(m_{(t+l)} - m_t)}{m_a} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

m_a = massa da amostra;

$m_{(t+l)}$ = massa do tubo com o lipídio extraído;

m_t = massa do tubo

8.4.4 Proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi baseada na determinação de nitrogênio, pelo método de macro Kjeldahl, segundo AOAC (2005), o qual se baseia na decomposição da matéria orgânica (digestão) seguida de destilação, sendo o nitrogênio dosado por titulação. O fator 6,25 foi utilizado para converter o nitrogênio total em proteínas. Para a etapa da digestão, procedeu-se a pesagem de 0,3 g de amostra em tubo digestor, depois foi adicionado 7 mL de mistura digestora contendo catalisador (Sulfato de cobre desidratado e sulfato de potássio na proporção de 6:1) e ácido sulfúrico concentrado. O bloco com os tubos teve a temperatura aumentada 50 °C a cada 30 min até atingir 350 °C. Após atingir esta temperatura, ficou por um período de 1 h ou até verificar o aparecimento da cor verde e a inexistência de resíduos pretos. Em seguida, as amostras foram destiladas em destilador de nitrogênio (TECNAL, Piracicaba, Brasil) até volume final de aproximadamente 50 mL. Para isto, no aparelho de destilação, era adicionado 15 mL de NaOH a 40% ao tubo contendo a amostra digerida. A solução adquiria uma coloração escura e começava a liberação visível de gás (NH₃). O gás era condensado e coletado em um erlenmeyer contendo borato. Posteriormente foram tituladas com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ para determinação do nitrogênio. As proteínas totais foram calculadas utilizando a equação 6 (AOAC, 2005):

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{(V_a - V_b) * C_{HCl} * F_c * 0,014}{m_a} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

V_a = volume gasto na titulação com a amostras;

V_b = volume gasto na titulação do branco;

C_{HCl} = concentração do ácido clorídrico;

F = fator de conversão = 6,25.

m_a = peso da amostra (g).

8.4.5 Carboidratos totais

Os carboidratos foram determinados por diferença dos demais constituintes da composição centesimal (umidade, cinzas, lipídios e proteínas), segundo AOAC (2005).

8.4.6 Valor energético total

O valor calórico dos feijões foi estimado utilizando-se os fatores de conversão de ATWATER: 4 kcal g⁻¹ para proteínas, 4 kcal g⁻¹ para carboidratos e 9 kcal g⁻¹ para lipídios (WATT; MERRIL, 1963).

8.5 Análise estatística

Os resultados de quantificação são apresentados como média \pm desvio padrão. Os coeficientes de Pearson (r) foram estimados para avaliar a correlação entre a composição centesimal, compostos fenólicos totais e as concentrações total, bioacessível e biodisponível de Cu, Mn e Mg das sementes de diferentes cultivares de feijão. Os valores considerados significativos foram para $r > 0,70$ e $p < 0,05$. Análises de componentes principais (PCA) foi aplicada para avaliar a similares entre as diferentes cultivares de feijão estudadas. Para isso o *software* PAST (versão 4.03) foi usado.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Controle de qualidade das determinações dos elementos

Embora o ICP-MS tenha características desejáveis e superior à de outras técnicas analíticas incluindo alta sensibilidade, ampla faixa linear dinâmica, análise multielementar, habilidade para discriminar e simples preparo de amostra, suas medidas podem sofrer efeito de matriz e interferências espectrais. Por exemplo, os isótopos $^{65}\text{Cu}^+$, $^{24}\text{Mg}^+$ e $^{55}\text{Mn}^+$ tem sobreposição de espécies isobáricas $^{40}\text{Ar}^{25}\text{Mg}^+$, $^{12}\text{C}_2^+$ e $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, respectivamente (MAY; WIEDMEYER, 1998). Com isso, para avaliar a exatidão das medidas, o material de referência NIST SRM 1568a de farinha de arroz foi decomposto e medida (n=3) a concentração total dos elementos em estudo. As concentrações medidas para Cu, Mn e Mg foram $2,92 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$ comparado a $2,35 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$, $18,0 \pm 1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ comparado a $19,2 \pm 1,8 \text{ mg kg}^{-1}$, $399 \pm 13 \text{ mg kg}^{-1}$ comparado a $559 \pm 10 \text{ mg kg}^{-1}$. Aplicando teste t pareado a diferença entre as concentrações medidas e certificadas não foi significativa para Cu ($p < 0,02$) e Mn ($p < 0,05$), bem como para Mg com $p < 0,002$. O coeficiente de variação para as medidas dos minerais no SRM NIST 1568a foi inferior a 7,9%, indicando com isso uma boa precisão.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados como 3x e 10x o desvio padrão dos brancos e os valores foram $0,01$ e $0,05 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, $0,01$ e $0,04 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,98$ e $3,28 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, para Cu, Mn e Mg, respectivamente. Os valores satisfatórios dos parâmetros indicam que as estratégias analíticas aplicadas como preparo da amostra, cela de colisão com gás He, uso de curva de calibração com semelhança de matriz e padrão interno (^{72}Ge) foram eficazes, assegurando a confiabilidade dos resultados encontrados aqui.

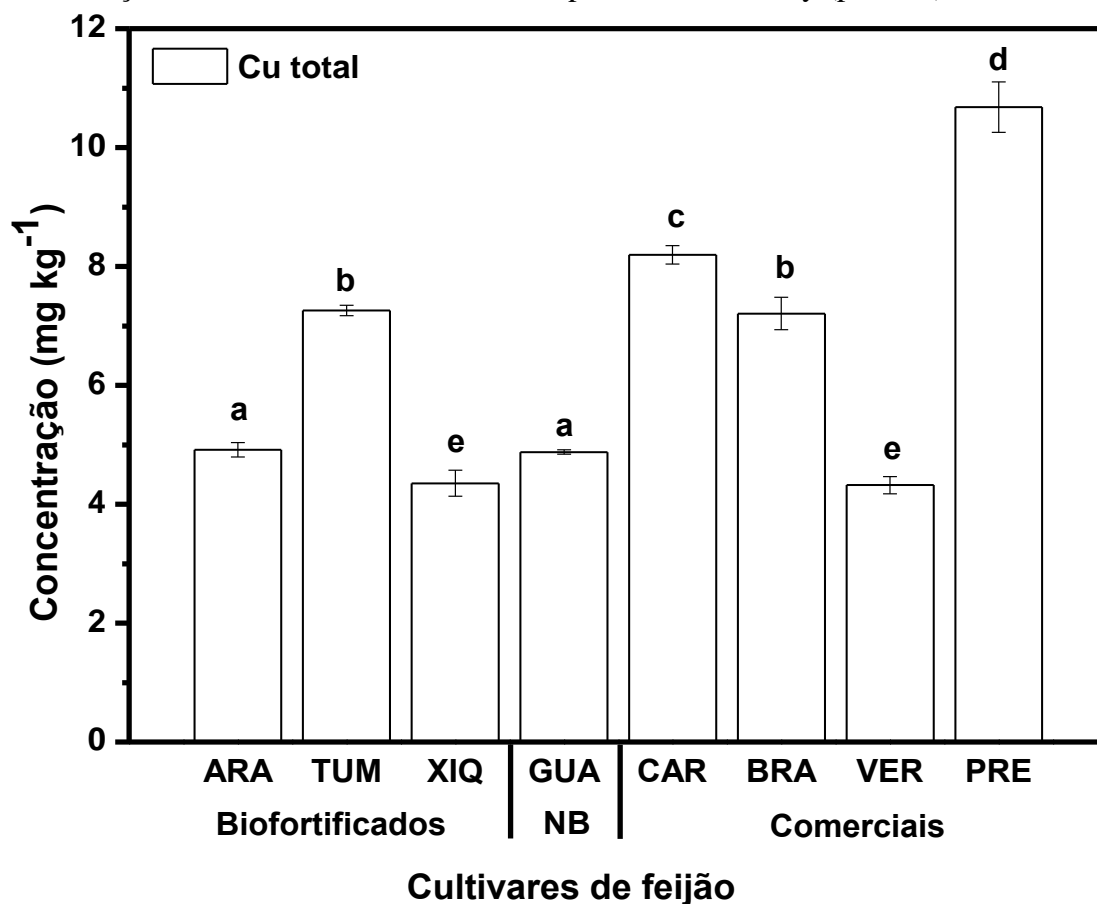
9.2 Concentração total, bioacessível e biodisponível dos nutrientes minerais nos feijões crus

9.2.1 Cobre

Como pode ser visto na Figura 13, a concentração total de Cu nas sementes das cultivares de feijão estudadas variou entre 4,4 (VER) e $10,7 \text{ mg kg}^{-1}$ (PRE). Em média,

a concentração de cobre nas sementes das cultivares de feijão-caupi foi *ca.* 42% menor ao das cultivares de feijão comercial.

Figura 13: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) total de cobre e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

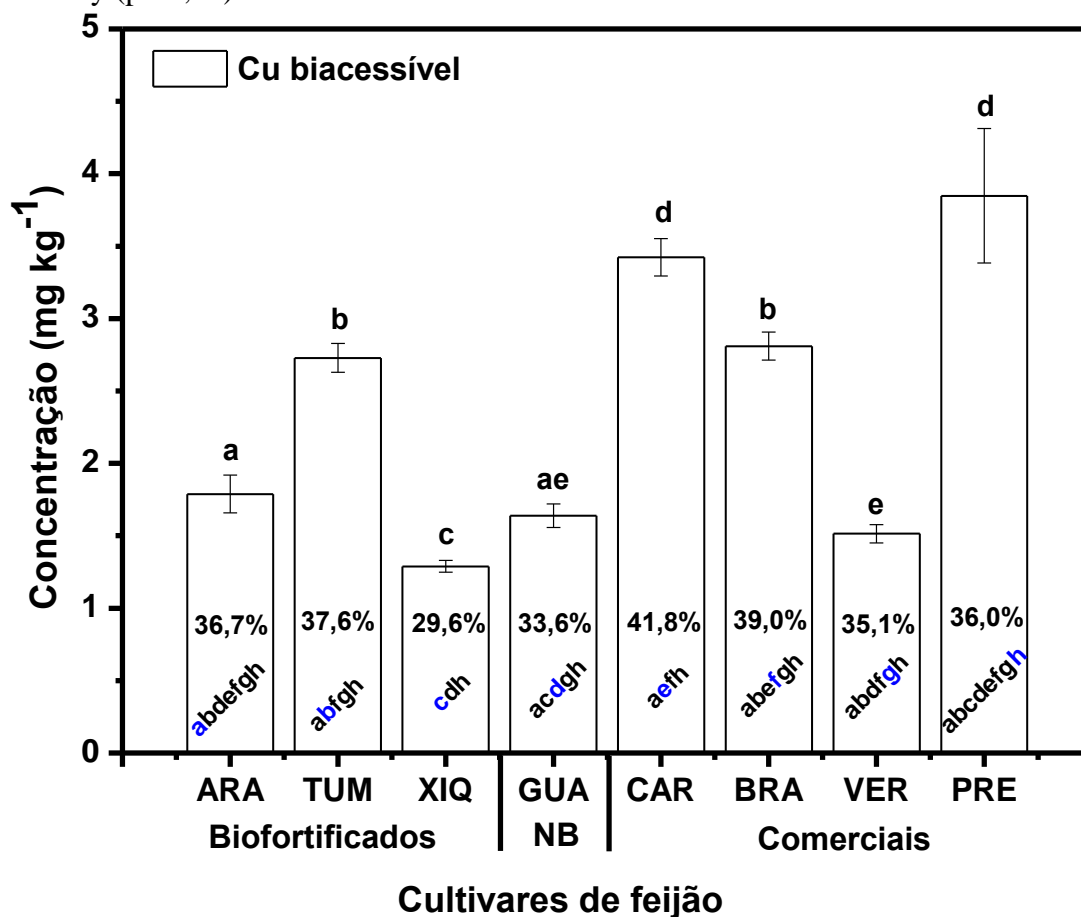


Embora a cultivar biofortificada Tumucumaque tenha sido a mais rica, entre as sementes de feijão-caupi, a concentração de Cu encontrada em suas sementes foi inferior *ca.* 11% e 32% ao das cultivares comerciais Carioca e Preto, respectivamente. FONTENELE *et al.*, (2012b) determinaram a concentração de Cu em sementes de Tumucumaque, Xiquexique e Guariba e em outras 27 cultivares brasileiras de feijão-caupi e os valores encontrados foram na faixa de 20 a 22 mg kg^{-1} . FEITOSA *et al.*, (2018) já relataram concentração de Cu em feijão Preto próximo de *ca.* 12,5 mg kg^{-1} . Com isso a concentração de cobre das cultivares estudadas aqui foram menores em relação ao trabalho de FONTENELE *et al.*, (2012b) e FEITOSA *et al.*, (2018). Tal fato pode estar relacionado a alguns fatores como condições endofoclimáticas e cultivo das

plantas que interferem na captação, transporte e armazenamento de nutrientes minerais em suas sementes.

Com relação à concentração bioacessível de cobre, observou-se que foi proporcional sua concentração total no qual os valores encontrados nas sementes das cultivares de feijão-caupi foram, em média, *ca.* 36% inferior aos de feijão comercial (ver Figura 14).

Figura 14: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) bioacessível de cobre e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



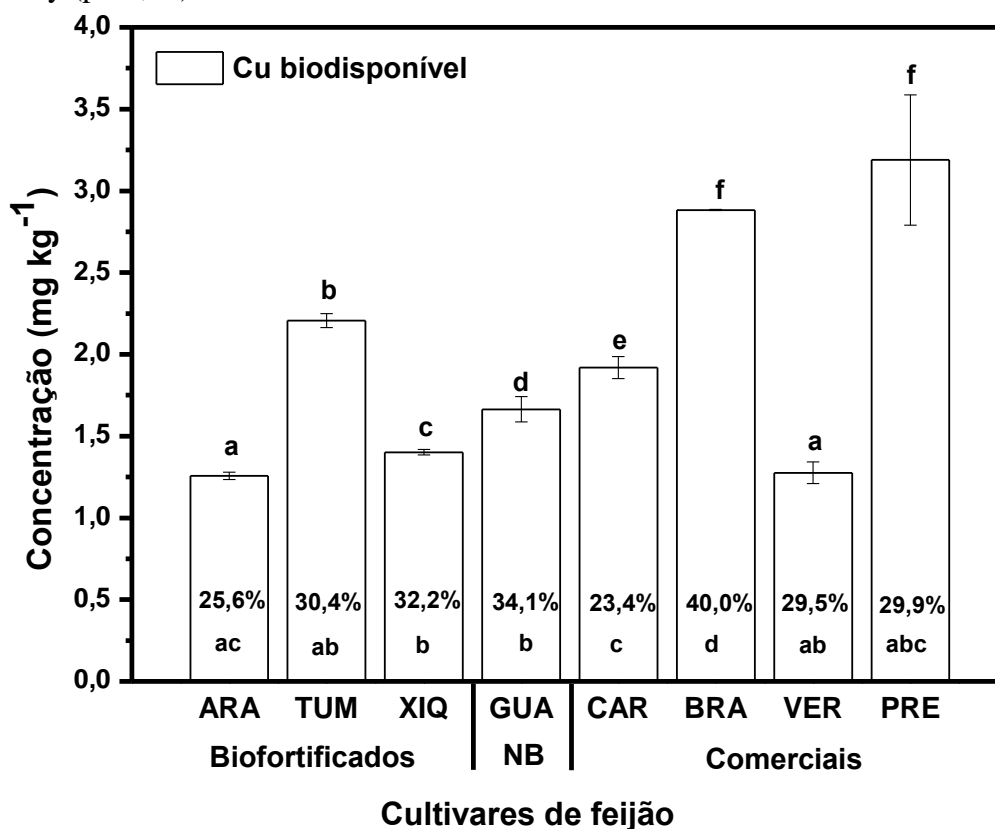
As cultivares comerciais Carioca e Preto apresentaram as maiores concentrações bioacessíveis de cobre e esses valores são significativamente diferentes das cultivares de feijão-caupi conforme teste Tukey ($p < 0,05$). No grupo das cultivares de feijão-caupi, a cultivar biofortificada Tumucumaque apresentou a maior concentração, já na cultivar biofortificada Xiquexique foi obtido a menor concentração entre todas as amostras analisadas. No entanto, em termos percentuais, a fração de bioacessível de Cu não

apresentou muita diferença entre os grupos biofortificado, não biofortificado e comercial.

A variação ficou de 29,6% (Xiquexique) a 37,6% (Tumucumaque) e 35,1% (Verde) a 41,8% (Carioca) em sementes de cultivares feijão-caupi e feijão comercial, respectivamente (Figura 14). A cultivar Preto apresentou percentual de bioacessibilidade de cobre semelhante a todas as amostras analisadas. Na cultivar biofortificada Xiquexique foi observado percentual bioacessível de cobre inferior ao das demais cultivares biofortificadas (Aracê e Tumucumaque) e semelhante a cultivar não biofortificada Guariba.

Na Figura 15, também é apresentado um perfil semelhante ao encontrado no gráfico de cobre total (Figura 13), demonstrando que as amostras que apresentaram maior concentração de cobre total, também apresentaram maior concentração de cobre biodisponível (correlação positiva), exceto para as cultivares Carioca e Aracê a qual apresentaram uma redução significativa para biodisponibilidade do micronutriente.

Figura 15: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) biodisponível de cobre e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Na Figura 15, observa-se ainda que as cultivares com maior concentração de cobre biodisponível foram Branco e Preto, já as que apresentaram a menor concentração foi cultivar biofortificada Aracê e comercial Verde. Dentro do grupo das cultivares de feijão-caupi foi obtido na cultivar biofortificada Tumucumaque a maior concentração de cobre biodisponível (2 mg kg^{-1}). Para a fração biodisponível de cobre em sementes de cultivares de feijão-caupi ocorreu uma variação de 26% a 34% enquanto para feijão comercial foi na faixa 23% a 40%. A fração biodisponível de cobre na cultivar não biofortificada Guariba (34%) foi estatisticamente semelhante à média encontrada para as cultivares biofortificadas Tumucumaque e Xiquexique, porém superior a Aracê ao aplicar o teste Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados revelam que o melhoramento genético focado na biofortificação de Fe e Zn promoveu um efeito pouco significativo na concentração total de Cu em sementes das novas cultivares de feijão-caupi. Este comportamento pode estar associado a interação entre os micronutrientes nos processos fisiológicos de captação, translocação e armazenamento nas plantas. Cobre, ferro e zinco compartilham biomoléculas transportadoras e estrutura de acumulação. Então a biofortificação de ferro e zinco pode ter limitado a quantidade de cobre nas sementes das novas cultivares de feijão-caupi. No entanto, a disponibilidade de cobre foi similar nas sementes das diferentes cultivares de feijão estudadas aqui.

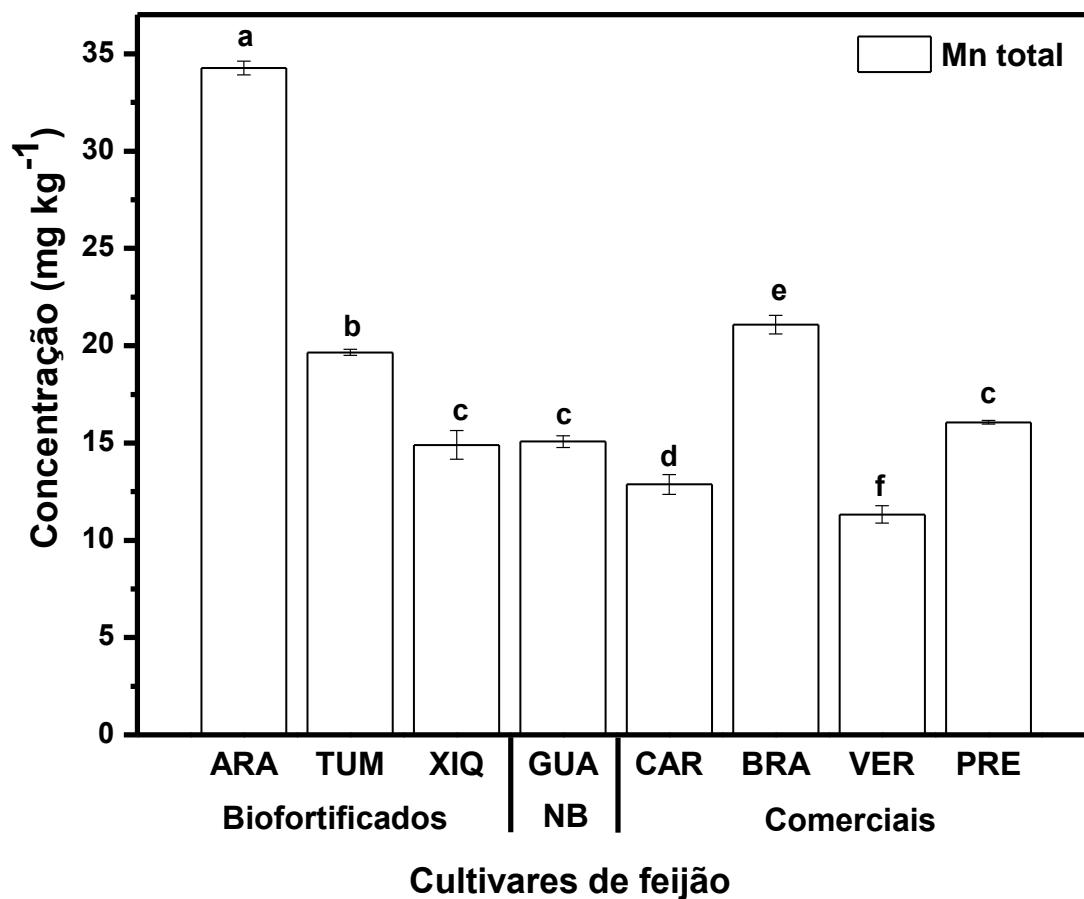
9.2.2 Manganês

Comparando-se as Figuras 13 e 16, nota-se que Mn é mais abundante que Cu nas sementes das diferentes cultivares dos feijões estudadas no qual sua concentração média de cobre nas cultivares de feijão-caupi foi de $5,4 \text{ mg kg}^{-1}$, já de manganês foi de $21,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Já nos feijões comerciais a média de cobre e manganês foi de 7,6 e $15,3 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Com isso, a concentração total de Mn em sementes das cultivares de feijão-caupi foram de 2,7 (Tumucumaque) a 7,0 (Aracê) vezes superior à de Cu, enquanto as cultivares comerciais apresentaram concentração *ca.* 1,5 (Preto) a 2,9 (Branco) vezes maior. Esta menor diferença entre as concentrações de Mn e Cu em semente de feijão comum também foi observada por PEREIRA *et al.*, (2020b) que avaliaram três genótipos de feijão comum Preto. Neste estudo, a cultivar biofortificada

Aracê (34,3 mg kg⁻¹) apresentou a maior concentração total de Mn (ver Figura 16) e significativamente diferente dos demais feijões indicados pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A concentração de Mn da cultivar biofortificada Aracê também foi superior ao de 30 cultivares de feijão-caupi estudadas por CARVALHO *et al.*, (2012). GERRANO *et al.*, (2019) também estudou inúmeras cultivares de feijão-caupi (*ca.* 22 genótipos) e a concentração de Mn encontrada foi menor comparada as das cultivares biofortificadas Aracê, Tumucumaque e Xiquexique avaliadas aqui.

Figura 16: Concentração (mg kg⁻¹, n=3) total de manganês em sementes de cultivares crua de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

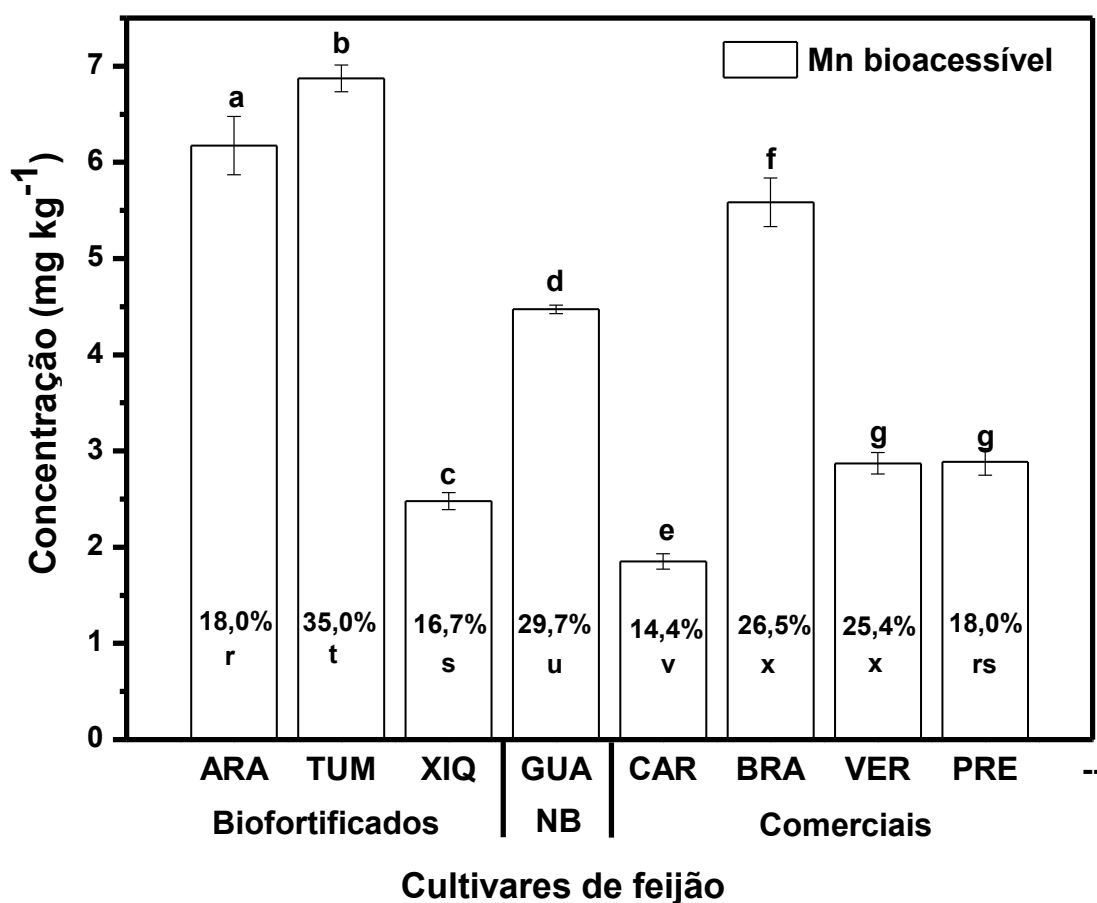


Nossos resultados também são superiores aos reportados por KUMARI; PLATEL, (2017) que encontraram uma concentração total de Mn *ca.* 10 e 9 mg kg⁻¹ para feijão-caupi e feijão comercial, respectivamente. A cultivar biofortificada Xiquexique apresentou concentração semelhante a não biofortificada Guariba, sendo as menores concentrações entre as amostras de feijão-caupi, porém superior as cultivares

comerciais Carioca e Verde, que obteve as menores concentrações entre as amostras analisadas.

Estes resultados indicam que processo de melhoramento genético visando a biofortificação de cultivares de feijão-caupi com ferro e zinco também promove um aumento na concentração de manganês sem ultrapassar o limite diário de 0,14 mg/ kg de peso corporal (EPA, 1995), já que considerando o resultado encontrado para a cultivar biofortificada Aracê e a ingestão para uma pessoa de 70 kg, seria necessária uma ingestão diária superior a 280 g de feijão. Com isso o enriquecimento de culturas básicas da dieta com manganês tem importante papel para a imunidade inata e sistema nervoso humano (NEVES; SOUZA; DE LEMOS, 2020). Como pode ser observado na Figura 17, a concentração bioacessível de Mn em sementes de cultivares de feijão-caupi foi *ca.* 52% maior comparada cultivares feijão comercial.

Figura 17: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) bioacessível e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



As cultivares biofortificadas Tumucumaque e Aracê apresentaram as maiores concentrações bioacessíveis de Mn e a diferença é significativa em relação às demais cultivares conforme teste Tukey ($p < 0,05$). A concentração bioacessível em sementes da cultivar não-biofortificada Guariba foi superior a concentração encontrada na cultivar biofortificada Xiquexique e superior também as cultivares comerciais Verde, Preto e Carioca.

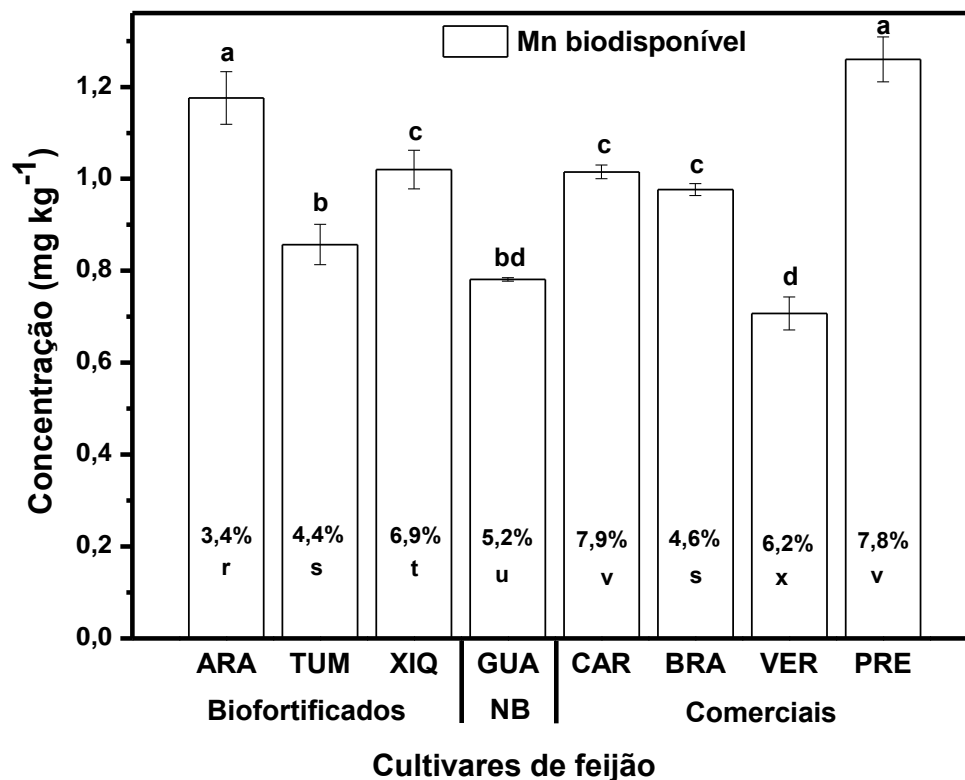
A fração bioacessível de Mn nas sementes das cultivares de feijão-caupi foi na faixa de 17% (Xiquexique) a 35% (Tumucumaque) enquanto nas cultivares comerciais variou de 14% (Carioca) a 27% (Branco). Apesar do percentual da cultivar comercial Branco ser superior ao da cultivar biofortificada Aracê, a contribuição da cultivar biofortificada é superior, considerando a ingestão da mesma quantidade de feijão. No estudo realizado por (KUMARI; PLATEL, 2017), também foi encontrada maior fração bioacessível de Mn em feijão-caupi (44%) em comparação ao feijão comum (35%).

Para a biodisponibilidade de Mn observa-se, na Figura 18, que as concentrações da cultivar biofortificada Aracê e comercial Preto são estatisticamente semelhantes e as maiores entre as amostras analisadas, já a cultivar comercial Verde, com valor semelhante a cultivar não biofortificada Guariba, apresentou a menor concentração.

Considerando a fração biodisponível de Mn, os valores percentuais foram na faixa de 3 a 7% e 5 a 8% para cultivares de feijão-caupi e feijão comercial, respectivamente. Apesar da cultivar biofortificada Aracê apresentar o menor percentual de contribuição, ela contribui com uma quantidade superior de manganês disponível, em mg, do que a cultivar comercial Carioca e Preto, que apresentaram os maiores percentuais biodisponíveis.

Conforme reportado por NOSRATPOUR; JAFARI, (2018), a disponibilidade de Mn em tecidos de matrizes vegetais comestíveis é *ca.* 5%. Assim as cultivares de feijão-caupi recém introduzidas, biofortificada Xiquexique e não biofortificada Guariba, bem como a maioria das cultivares de feijão comercial fornecem uma fração maior de manganês biodisponível. Comparando as Figuras 15 e 18, nota-se que a biodisponibilidade de Cu é superior à de Mn, sendo maior que 6,6 e 4,7 vezes nas cultivares biofortificadas e não-biofortificada, respectivamente.

Figura 18: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) biodisponível e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Essa diferença na biodisponibilidade tem relação com a interação entre os micronutrientes e os demais compostos do tecido vegetal comestível. Alguns estudos têm demonstrado a forte interação do Mn com Ca, fibras e fitatos resultando em complexos insolúveis que diminuem a fração solúvel disponível do micronutriente para absorção no trato intestinal humano (NOSRATPOUR; JAFARI, 2018).

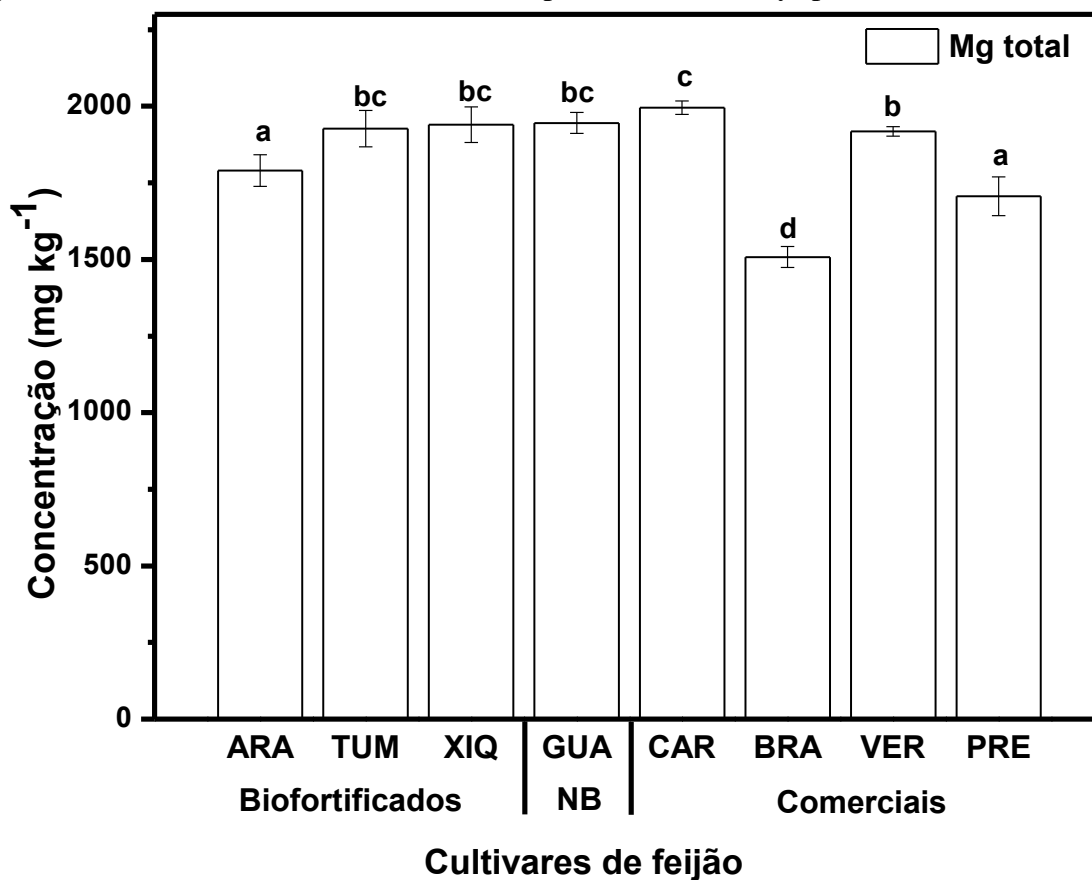
9.2.3 Magnésio

Ao contrário de Cu e Mn, o Mg é um macroelemento com abundância similar ao potássio e fósforo em sementes de feijão (GULATI; ROSE, 2018; PEREIRA *et al.*, 2020a). A Figura 19, 20 e 21 mostram as concentrações concentração total, bioacessível e biodisponível de Mg em sementes das cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificado e não biofortificado. A variação de Mg total foi maior no grupo das cultivares comerciais (1508 a 1995 mg kg^{-1}) em comparação as cultivares de feijão-caupi (1790 a 1946 mg kg^{-1}). Como pode ser visto na Figura 19, a cultivar comercial

Branco apresentou a menor concentração de Mg total (1508 mg kg^{-1}), enquanto na cultivar comercial Carioca foi encontrado a maior concentração (1995 mg kg^{-1}), sendo esta semelhante estatisticamente aos valores encontrados nas cultivares biofortificadas Xiquexique (1940 mg kg^{-1}) e Tumucumaque (1927 mg kg^{-1}) e não biofortificada Guariba (1946 mg kg^{-1}).

No grupo das cultivares de feijão-caupi a cultivar biofortificada Aracê apresentou a menor concentração de Mg total. AVANZA *et al.*, (2013) determinaram a concentração total de Mg em cultivares de feijão-caupi cultivadas no nordeste da Argentina e os valores encontrados variaram entre 620 e 760 mg kg^{-1} e são inferiores aos nossos achados para as cultivares de feijão-caupi brasileiras. Em contrapartida, os nossos resultados foram inferiores ao das cultivares de feijão-caupi do sudeste da África estudadas por NAIKER; GERRANO; MELLEM, (2019) que apresentaram concentração de Mg variando de 4538 a 4963 mg kg^{-1} .

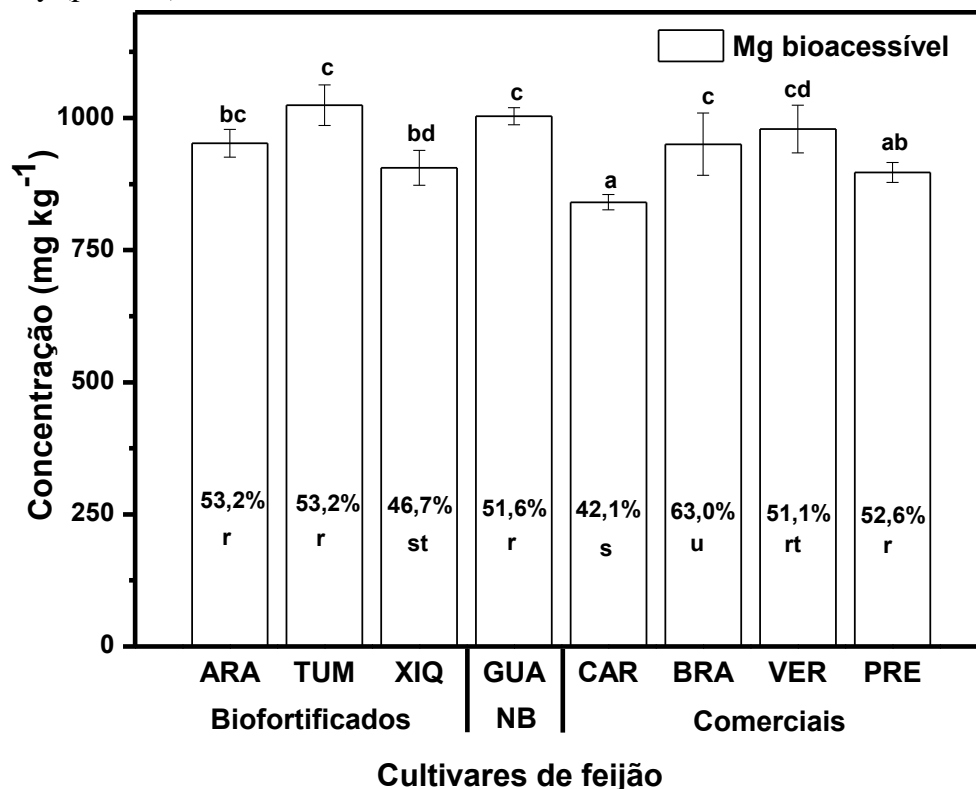
Figura 19: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) total em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Comparando a concentração de Mg em feijão comum reportados na literatura, nota-se que LOVATO *et al.*, (2018) encontrou concentração de magnésio na cultivar comercial Carioca superior ao do feijão Preto com valores de 2108 e 1868 mg kg⁻¹, respectivamente, similares aos do nosso estudo. Por outro lado, no recente trabalho desenvolvido por RIBEIRO; KLÄSENER, (2020) investigando 17 genótipos de feijão comum, a concentração média de Mg foi 2300 mg kg⁻¹, valor este superior ao encontrado neste trabalho.

Como pode ser visto na (Figura 20), a concentração bioacessível de Mg das cultivares de feijão-caupi são estatisticamente semelhantes à das cultivares de feijão comercial. A cultivar biofortificada Tumucumaque e não biofortificada Guariba apresentam os valores mais altos, em média, mas a diferença somente é significativa considerando a concentração bioacessível de Mg nas cultivares comerciais Carioca e Preto e biofortificada Xiquexique, conforme teste Tukey ($p < 0,05$). A fração bioacessível de magnésio em sementes das diferentes cultivares de feijões estudados foi superior a 50%, exceto para as cultivares Xiquexique (46,7%) e Carioca (42,1%).

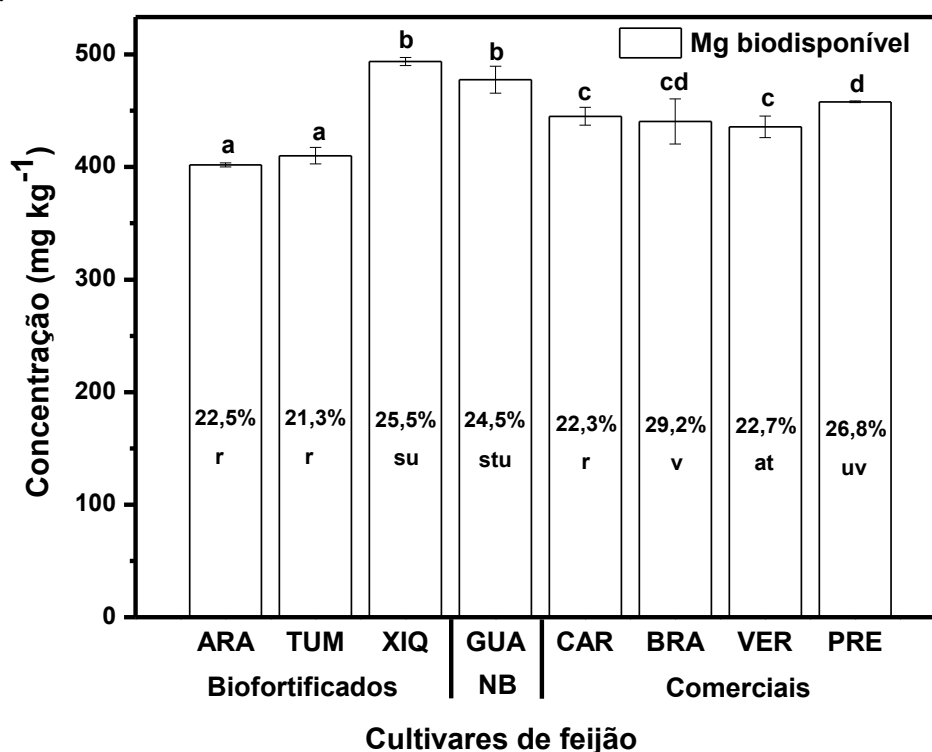
Figura 20: Concentração (mg kg⁻¹, n=3) bioacessível de magnésio e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de concentração ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Os resultados de bioacessibilidade de Mg encontrados para as cultivares de feijão-caupi e feijão comercial foram superiores aos encontrados por KAFAOGLU *et al.*, (2016) para avelãs, amêndoas, amendoim, castanha de caju, castanha-do-pará e nozes que foram na faixa de 15,7% - 28,2%. Por outro lado, MINGRONI *et al.*, (2018) avaliaram vegetais comestíveis frescos como maçã, banana e mamão e encontraram valores para fração bioacessível de Mg variando de 60,5 a 66,3%, superiores aos determinados nas sete das oito cultivares de feijão estudada.

Observando Figura 21, os feijões comerciais apresentaram concentração biodisponível de magnésio intermediária em relação aos resultados encontrados nas cultivares de feijão-caupi, visto que maiores e menores foram encontradas nas cultivares destas amostras.

Figura 21: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) biodisponível de magnésio e frações (%) em sementes cruas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada. Letra minúscula diferente dentro das colunas ou no topo delas significa que as médias de ou percentuais são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



O menor resultado encontrado foi da cultivar biofortificada Aracê ($401,921 \pm 1,766 \text{ mg kg}^{-1}$) e o maior na cultivar biofortificada Xiquexique ($493,773 \pm 3,501 \text{ mg kg}^{-1}$). O resultado encontrado para a cultivar biofortificada Tumucumaque foi

estatisticamente semelhante ao da cultivar biofortificada Aracê, já o encontrado para a cultivar não biofortificada Guariba ao da cultivar biofortificada Xiquexique.

A fração biodisponível de Mg em todas as sementes das cultivares de feijão foi superior a 20% e o teste Tukey aplicado ($p < 0,05$) mostrou que o maior percentual encontrado *ca.* 29,2% para a cultivar comercial Branco é estatisticamente semelhante apenas ao resultado da cultivar, também comercial, Preto. Na comparação com outros vegetais comestíveis, a absorção de Mg consumindo as cultivares de feijão-caupi biofortificadas (23,1%) e não biofortificadas (24,5%) é similar ou superior a ingestão de noz (17,5%), castanha do Brasil (16,3%), pistachie (20,4%), avelã (17,9%), semente de abobora (23,6%) e girassol (6,0%) (MOREDA *et al.*, 2016). Estes resultados mostram que o consumo das cultivares de feijão-caupi contribui significativamente para atender à necessidade diária de absorção de magnésio para dieta humana.

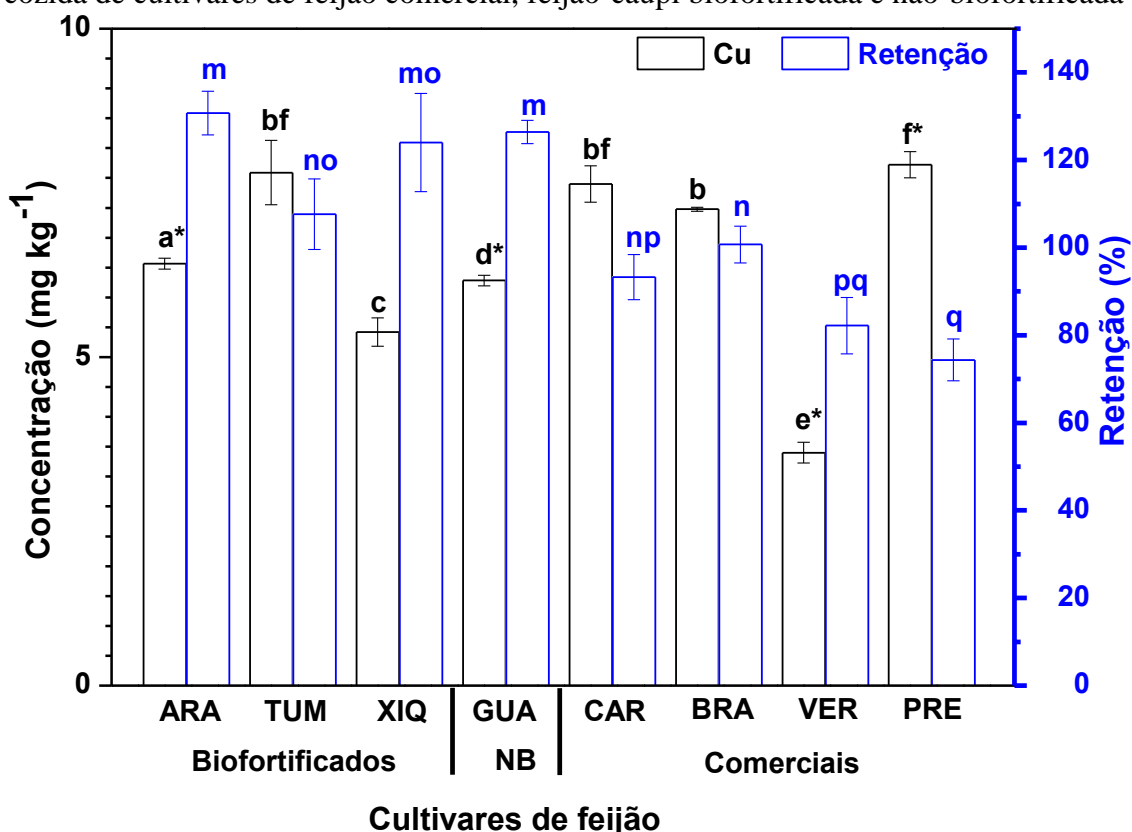
9.3 Concentração total, bioacessível e biodisponível dos nutrientes minerais nos feijões cozidos

Os feijões normalmente quando consumidos como sementes inteiras são cozidos aplicando métodos suaves ou severos para superar o defeito “difícil de cozinhar” (PHILLIPS, 2013). Os métodos de cozimento também interferem nos aspectos nutricionais de feijão (AVANZA *et al.*, 2013). Recentemente, COELHO *et al.*, (2021) revelaram que a bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro e zinco são maiores em sementes de feijão-caupi e feijão comercial cozidas bem como observaram um baixo percentual de lixiviação e contaminação. Então, foram avaliados os efeitos na concentração de cobre, manganês e magnésio após o procedimento e sistema de cozimento para amostras de feijão desse estudo. A concentração total determinada para cobre, manganês e magnésio nas sementes cozidas das diferentes cultivares de feijões estudadas é mostrada na Figura 22, 23 e 24.

O fator de retenção foi estimado para avaliar o efeito do cozimento sobre a concentração dos nutrientes minerais nas sementes das cultivares de feijão (COELHO *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2014). Como pode ser observado na Figura 22, o fator de retenção de Cu para cultivares de feijão-caupi foram superiores a 120%, exceto para a cultivar biofortificada Tumucumaque que apresentou retenção de 108%, valor este estatisticamente semelhante ao encontrado nas cultivares comerciais Branco e Carioca.

Os menores percentuais de retenção de cobre (ver Figura 22) foram encontrados nas cultivares comerciais Preto (74%) e Verde (82%). Os dados mostram que apenas os feijões comerciais sofreram diminuição de cobre após o cozimento. PEREIRA *et al.*, (2020a) também encontraram baixos valores para o fator de retenção de cobre em sementes de cultivares de feijão comum cozidas em um sistema similar ao usado neste estudo.

Figura 22: Concentração total (mg kg^{-1}) de cobre fator de retenção (%) em sementes cozida de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada



*Diferente em relação as sementes das cultivares de feijão cru.

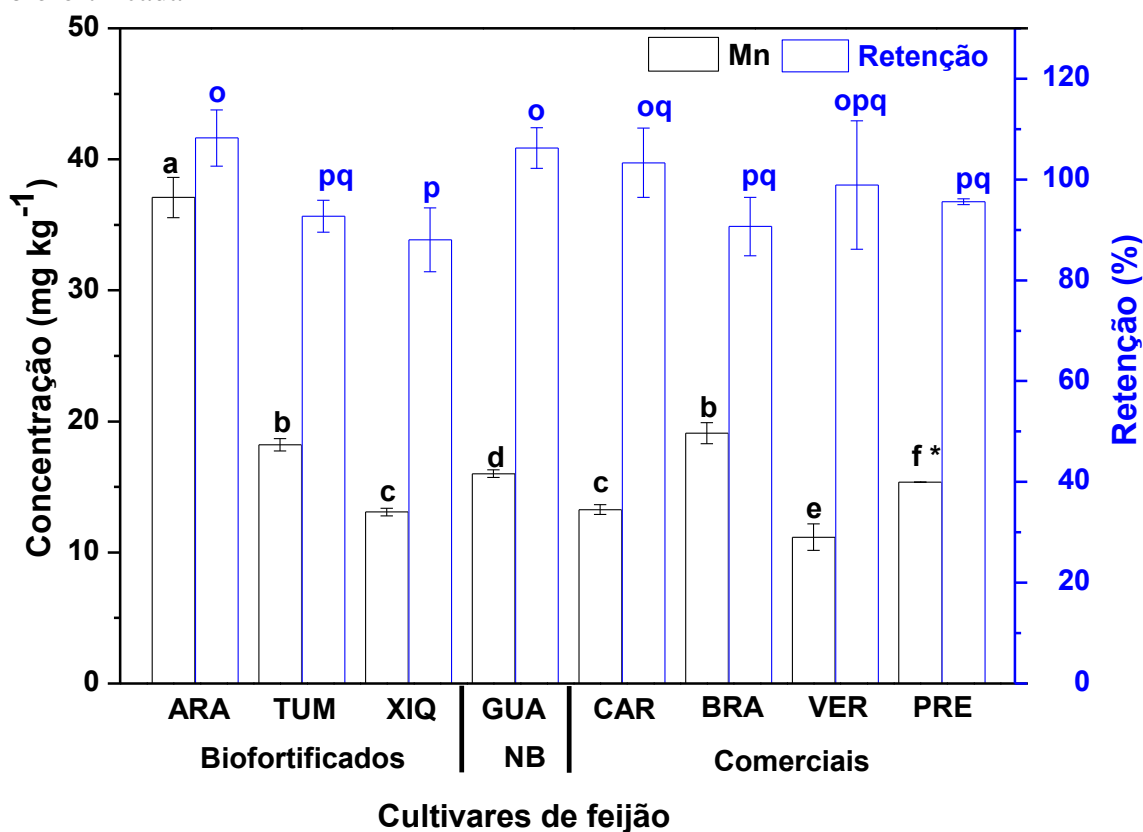
Na comparação com a concentração de Cu nos feijões cru observa-se que a cultivar biofortificada Aracê e a não biofortificada Guariba apresentaram concentrações superiores e estatisticamente diferente. Porém, as cultivares comerciais Preto e Verde, que tiveram os menores percentuais de retenção, apresentaram concentrações estatisticamente diferente ao encontrado na forma crua.

Considerando o fator de retenção de manganês (ver Figura 23), os valores em médias foram 99% e 97% para as cultivares de feijão-caupi e feijão comercial, respectivamente. Com isso não houve diferença significativa na retenção de Mn nestes

dois grupos de feijão. Em média, as retenções das cultivares biofortificada Aracê ($108 \pm 6\%$) e não biofortificada Guariba ($106 \pm 4\%$) foram as maiores encontradas, sendo estas estatisticamente semelhantes às retenções das cultivares comerciais Carioca ($103 \pm 7\%$) e Verde ($99 \pm 13\%$).

Assim como ocorreu com a concentração de cobre após o cozimento, a cultivar comercial Preto reduziu significativamente a concentração de manganês. As demais cultivares apresentaram concentração, após o cozimento, semelhante ao encontrado na forma crua.

Figura 23: Concentração total (mg kg^{-1}) de manganês e fator de retenção (%) em sementes cozida de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada

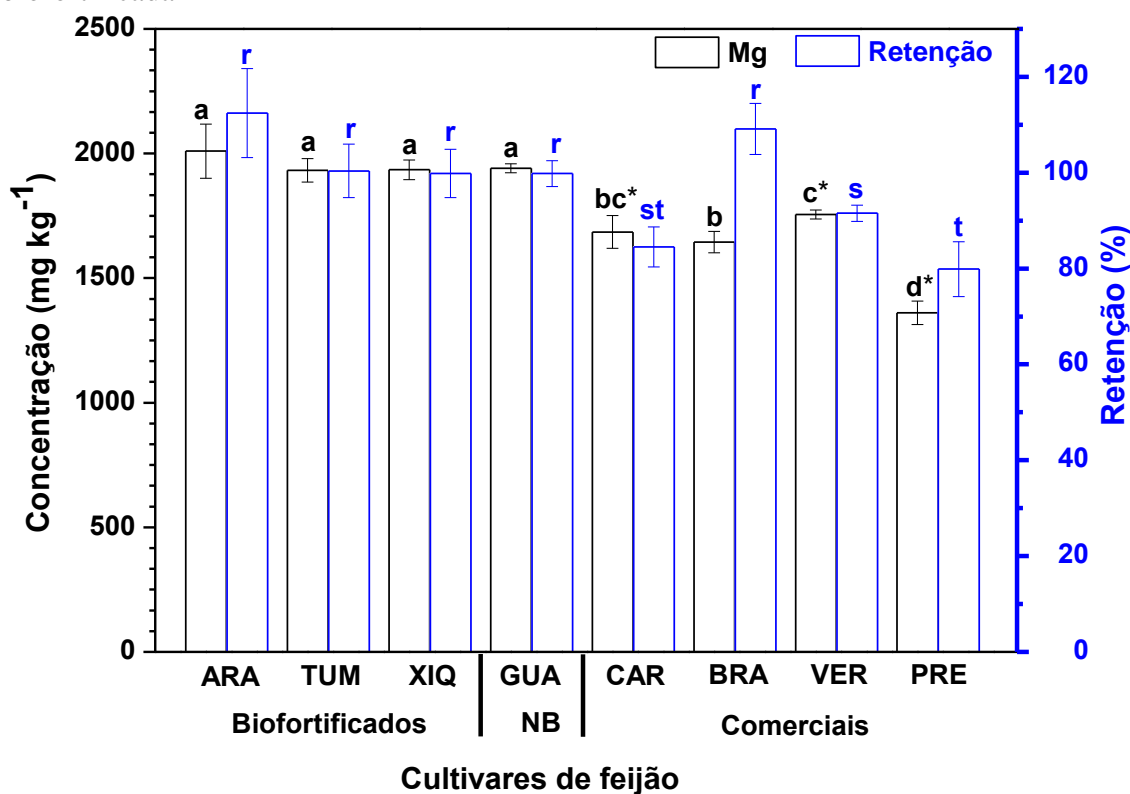


*Diferente em relação as sementes das cultivares de feijão cru.

Esses resultados indicam que o efeito do cozimento na concentração de manganês nas sementes de feijão é pouco significativo. Em contrapartida, PEREIRA *et al.*, (2020a) demonstraram uma elevada redução da concentração de manganês em sementes cozidas de cultivares de feijão comum encontrando um baixo fator médio de retenção *ca.* $37,3 \pm 4,7\%$.

O fator de retenção de magnésio (ver Figura 24) de cultivares de feijão-caupi variou de 113% (Aracê) a 100% (Guariba), enquanto para as cultivares comerciais variaram entre 80% (Preto) e 109% (Branco). As retenções da cultivar comercial Branco e das cultivares de feijão-caupi foram estatisticamente semelhantes e superior as retenções das cultivares comerciais Carioca, Verde e Preto. Já com relação a concentração total de magnésio nos feijões cozidos, verificou-se que os resultados encontrados nas cultivares de feijão-caupi são estatisticamente semelhantes entre si e superiores ao encontrado nas cultivares comerciais estudadas.

Figura 24: Concentração total (mg kg^{-1}) de magnésio e fator de retenção (%) em sementes cozida de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada



*Diferente em relação as sementes das cultivares de feijão cru.

Comparando com a concentração encontrada nos feijões na forma crua verifica-se que as cultivares de feijão-caupi mantiveram suas concentrações estatisticamente semelhante. Nas cultivares comerciais Carioca, Preto e Verde, o cozimento provocou uma redução na concentração de magnésio. Assim como já relatado para a concentração total de cobre e manganês, a cultivar comercial Preto também reduziu significativamente a concentração de magnésio, sendo o único feijão, entre os

analisados que não conseguiu manter a concentração de Cu, Mn e Mg ao encontrado na forma crua. AVANZA *et al.*, (2013) verificaram uma redução na concentração de magnésio total em sementes de alguns genótipos de feijão-caupi somente após 40 min de cozimento em panela aberta. De fato, estes achados mostram que as cultivares de feijão-caupi são capazes de manter a concentração de nutrientes minerais após método de cozimento comumente aplicado.

Na Tabela 5, é apresentada a concentração bioacessível dos nutrientes minerais em sementes cozidas das diferentes cultivares de feijão-caupi e feijão comercial. As cultivares de feijão-caupi apresentaram concentração bioacessível de cobre estatisticamente semelhante aos feijões comerciais, conforme teste Tukey ($p < 0,05$). Dentro do grupo das cultivares de feijão-caupi, a cultivar biofortificada Xiquexique apresentou concentração semelhante a cultivar não biofortificada Guariba, já nas cultivares biofortificadas Aracê e Tumucumaque foram obtidas concentrações superiores as outras duas mencionadas (Guariba e Xiquexique).

Tabela 5: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) bioacessível e frações (%) de cobre, manganês e magnésio em sementes cozidas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não biofortificada.

Amostras	Cu		Mn		Mg	
	[Cu] ¹	%	[Mn] ¹	%	[Mg] ¹	%
ARA	2,48 ± 0,07 ^{a*}	38,67 ± 0,55 ^a	6,41 ± 0,35 ^a	17,28 ± 0,22 ^a	1183,69 ± 48,34 ^{a*}	58,93 ± 0,77 ^{a*}
TUM	2,75 ± 0,05 ^b	35,28 ± 1,60 ^{bd}	5,75 ± 0,11 ^{b*}	31,57 ± 0,22 ^{b*}	1074,04 ± 27,06 ^b	55,59 ± 0,03 ^b
XIQ	2,05 ± 0,09 ^{c*}	38,00 ± 0,13 ^{a*}	1,96 ± 0,02 ^{c*}	14,95 ± 0,15 ^c	1288,34 ± 64,21 ^{a*}	66,56 ± 1,96 ^{c*}
GUA	2,11 ± 0,06 ^{c*}	34,19 ± 0,52 ^b	3,58 ± 0,22 ^{d*}	22,36 ± 0,96 ^{d*}	1357,65 ± 14,65 ^{a*}	69,93 ± 0,11 ^{d*}
BRA	2,96 ± 0,02 ^d	40,76 ± 0,06 ^c	3,25 ± 0,04 ^{d*}	17,05 ± 0,51 ^{a*}	972,78 ± 13,41 ^c	59,17 ± 0,72 ^a
CAR	2,73 ± 0,04 ^{b*}	35,79 ± 0,75 ^d	1,91 ± 0,05 ^c	14,39 ± 0,02 ^e	875,90 ± 28,15 ^d	51,98 ± 0,35 ^{e*}
PRE	3,94 ± 0,14 ^e	49,63 ± 0,46 ^{e*}	2,77 ± 0,03 ^e	18,01 ± 0,21 ^f	886,03 ± 20,10 ^d	65,13 ± 0,78 ^{c*}
VER	1,47 ± 0,03 ^f	41,51 ± 1,12 ^c	2,38 ± 0,09 ^{f*}	21,43 ± 0,96 ^d	1029,89 ± 6,74 ^b	58,67 ± 0,22 ^{a*}

*Diferente em relação as sementes das cultivares de feijão cru.

¹[elemento] = concentração do elemento.

A concentração bioacessível de cobre variou mais dentro do grupo das cultivares comerciais sendo que a cultivar Verde e Preto apresentaram a menor ($1,5 \text{ mg kg}^{-1}$) e

maior ($3,9 \text{ mg kg}^{-1}$) concentração entre todas as sementes analisadas. O cozimento aumentou significativamente a concentração bioacessível de cobre das cultivares biofortificada Aracê, Xiquexique e não biofortificada Guariba *ca.* 39%, 59% e 29%, respectivamente. Em contraste, sementes cozidas da cultivar comercial Carioca apresentaram concentração bioacessível de cobre 20% menor comparada às cruas, já a concentração bioacessível de cobre das demais cultivares comerciais não apresentaram diferença entre a forma crua e cozida.

A fração bioacessível de cobre foi superior a 34,2% em sementes cozidas das cultivares de feijão. A cultivar comercial Preto apresentou a maior fração bioacessível de cobre *ca.* 50% entre todas as cultivares analisadas. Já no grupo das cultivares de feijão-caupi, as biofortificadas Aracê e Xiquexique apresentaram valores superiores as cultivares não biofortificada Guariba e biofortificada Tumucumaque.

Considerando a bioacessibilidade de Mn, sua concentração média determinada em sementes cozidas das cultivares de feijão-caupi foi 1,7 vezes superior aos de feijão comercial. As mais altas concentração de Mn bioacessível foram apresentadas pelo feijão-caupi biofortificado Aracê ($6,4 \text{ mg kg}^{-1}$) e Tumucumaque ($5,8 \text{ mg kg}^{-1}$). A concentração obtida na não biofortificada Guariba foi superior ao da cultivar biofortificada Xiquexique e das comerciais Preto, Verde e Carioca.

Comparando com os resultados encontrados nas sementes crua, observa-se que o cozimento provocou uma redução significativa de 16%, 21% e 20% na concentração bioacessível de Mn em sementes das cultivares biofortificadas Tumucumaque, Xiquexique e não biofortificada Guariba bem como de 42% e 17% nas cultivares comerciais Branco e Verde, respectivamente. As cultivares comerciais Preto e Carioca e a biofortificada Aracê não apresentaram diferenças entre a forma crua e cozida. O maior percentual de Mn bioacessível também foi verificado em sementes cozidas da cultivar biofortificada Tumucumaque (32%) indicando que a biofortificação promove aumento na bioacessibilidade do micronutriente.

A concentração de magnésio bioacessível em sementes cozidas das cultivares de feijão-caupi foram maiores e significativamente diferentes daquelas de feijão comercial de acordo teste Tukey ($p < 0,05$), sendo que as cultivares não biofortificada Guariba e biofortificada Xiquexique apresentaram as maiores, já nas cultivares comerciais Carioca e Preto foram obtidos as menores concentrações de magnésio bioacessível.

Para a fração bioacessível de magnésio foi obtido na cultivar biofortificada Xiquexique (67%) e não biofortificada Guariba (70%) os maiores resultados e a cultivar

comercial Carioca (52%) a menor fração. O efeito do cozimento promoveu aumento na concentração bioacessível de magnésio em todas as cultivares de feijão-caupi, exceto Tumucumaque, sendo o aumento de 24%, 42%, 35%, nas cultivares biofortificada Aracê, Xiquexique e não biofortificada Guariba, respectivamente.

Este comportamento apresentado pelas cultivares de feijão-caupi pode estar relacionado a forma e interações do magnésio na matriz da amostra indicando que o macromineral liga-se fracamente a inibidores nutricionais tais como polifenóis, fitatos e taninos (DE OLIVEIRA; NAOZUKA, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018). De fato, os resultados indicam que as cultivares de feijão-caupi melhoram ainda mais o valor nutritivo quando cozidas em relação aos feijões comerciais.

Considerando a biodisponibilidade dos nutrientes minerais Cu, Mn e Mg presentes nas sementes cozidas na Tabela 6, as sementes cozidas das cultivares de feijão-caupi apresentam concentração e fração biodisponível de cobre estatisticamente semelhante aos feijões comerciais.

Tabela 6: Concentração (mg kg^{-1} , $n=3$) biodisponível e frações (%) de cobre, manganês e magnésio em sementes cozidas de cultivares de feijão comercial, feijão-caupi biofortificada e não-biofortificada.

Amostras	Cu		Mn		Mg	
	[Cu] ¹	%	[Mn] ¹	%	[Mg] ¹	%
ARA	2,04 ± 0,09 ^{a*}	31,77 ± 1,01 ^{ae*}	2,00 ± 0,06 ^{a*}	5,38 ± 0,06 ^{a*}	457,16 ± 24,46 ^{a*}	22,75 ± 0,01 ^a
TUM	1,86 ± 0,03 ^{b*}	23,87 ± 1,06 ^{b*}	0,89 ± 0,04 ^b	4,87 ± 0,09 ^{b*}	474,44 ± 5,22 ^{a*}	24,56 ± 0,33 ^{b*}
XIQ	1,90 ± 0,06 ^{ab*}	35,37 ± 0,34 ^c	0,75 ± 0,04 ^{c*}	5,71 ± 0,17 ^{c*}	536,15 ± 18,23 ^{b*}	27,71 ± 0,38 ^{c*}
GUA	1,86 ± 0,10 ^{ab*}	30,09 ± 1,15 ^{a*}	0,57 ± 0,01 ^{d*}	3,58 ± 0,01 ^{d*}	500,86 ± 8,36 ^{c*}	25,80 ± 0,19 ^d
BRA	2,00 ± 0,13 ^{ab*}	27,69 ± 1,63 ^{d*}	0,79 ± 0,02 ^{c*}	4,14 ± 0,09 ^{e*}	337,18 ± 15,69 ^{d*}	20,50 ± 0,42 ^{e*}
CAR	2,50 ± 0,07 ^{c*}	32,74 ± 0,34 ^{e*}	0,94 ± 0,04 ^{b*}	7,06 ± 0,11 ^{f*}	519,45 ± 5,07 ^{c*}	30,85 ± 0,90 ^{f*}
PRE	2,61 ± 0,03 ^c	32,86 ± 0,42 ^e	1,13 ± 0,03 ^{e*}	7,33 ± 0,17 ^f	369,34 ± 1,17 ^{e*}	27,16 ± 0,86 ^c
VER	1,37 ± 0,03 ^d	38,85 ± 0,77 ^{f*}	0,67 ± 0,01 ^f	6,06 ± 0,44 ^c	359,55 ± 14,63 ^{de*}	20,48 ± 0,62 ^{e*}

*Diferente em relação as sementes das cultivares de feijão cru.

¹[elemento] = concentração do elemento.

As cultivares comerciais apresentaram a maior e menor concentração de cobre biodisponível, sendo as cultivares comerciais Carioca e Preto os que apresentaram as

maiores e a Verde a menor. A fração biodisponível de cobre em sementes de cultivares de feijão-caupi variou entre 24% (Tumucumaque) e 35% (Xiquexique) enquanto para as cultivares comerciais foram na faixa de 28% (Branco) a 39% (Verde). Dentro do grupo das cultivares de feijão-caupi, a biofortificada Xiquexique apresentou fração biodisponível de cobre superior a não biofortificada Guariba.

O método de cozimento aumentou significativamente a biodisponibilidade de cobre em sementes cozidas das cultivares de feijão-caupi biofortificado Aracê (62%) e Xiquexique (36%) e não biofortificada Guariba (12%). Este comportamento também foi observado para a cultivar comercial Carioca (30%) enquanto as cultivares biofortificada Tumucumaque e comercial Branco apresentaram uma redução de 16% e 30%, respectivamente, na concentração de cobre biodisponível quando comparadas às de sementes cruas. Na fração biodisponível de cobre ocorreu aumento na cultivar biofortificadas Aracê (24%) e nas comerciais Carioca (40%) e Verde (31%).

A média da concentração biodisponível de manganês em feijão-caupi é, de acordo teste Tukey ($p < 0,05$), estatisticamente semelhante ao encontrado nas cultivares comerciais. A cultivar Aracê biofortificada e a não biofortificada Guariba apresentaram a maior e menor concentração de manganês biodisponível, respectivamente. Com isso todas as cultivares biofortificadas apresentaram concentração biodisponível de manganês superior à não biofortificada Guariba.

O percentual biodisponível de manganês em sementes de cultivares de feijão-caupi foi inferior ao de feijão comercial. Dentro do grupo das cultivares de feijão-caupi, todas as biofortificadas (Aracê, Tumucumaque e Xiquexique) apresentaram fração biodisponível de manganês superior a não biofortificada Guariba.

Em comparação com as amostras cruas, o cozimento promoveu um aumento de 70% na concentração biodisponível de manganês nas sementes da cultivar biofortificada Aracê enquanto para as cultivares biofortificada Xiquexique e não biofortificada Guariba observou-se uma redução semelhante de 27%. Entre as cultivares comerciais, Branco, Carioca e Preto sofreram redução na concentração biodisponível de manganês, com valores de 19%, 8% e 11% menor que o resultado encontrado nas sementes na forma crua.

Sobre a absorção de magnésio, as sementes cozidas das cultivares de feijão-caupi podem fornecer *ca.* 24% mais magnésio biodisponível do que os feijões comerciais. A cultivar biofortificada Xiquexique apresentou a maior concentração, já nas biofortificadas Aracê e Tumucumaque a concentração encontrada foi inferior a não

biofortificada Guariba, mas superior as comerciais Preto, Verde e Branco, que tiveram as menores concentrações de magnésio biodisponível.

Já a fração biodisponível de magnésio em feijões-caupi foi estatisticamente semelhante à de feijões comerciais, sendo que as cultivares comerciais Carioca e Verde apresentaram a maior e menor fração, com 31% e 21%, respectivamente. No grupo das cultivares de feijão-caupi a mesma sequência apresentada na concentração biodisponível de magnésio foi mantida para sua fração.

O método de cozimento interferiu significativamente na concentração biodisponível de magnésio de todas as cultivares estudadas provocando um aumento de 14%, 9%, 16% a absorção de magnésio quando consumido grãos cozidos das cultivares biofortificadas Aracê, Xiquexique e Tumucumaque, respectivamente. Por outro lado, a maioria das cultivares de feijão comercial cozidas apresentou menor biodisponibilidade de magnésio, exceto a cultivar comercial Carioca, que revelou um aumento de 16,7% para absorção do macronutriente.

O cozimento também aumentou em 15%, 9% e 38% a fração biodisponível de magnésio nas cultivares biofortificadas Tumucumaque e Xiquexique e na comercial Carioca. Para as cultivares biofortificada Aracê, não biofortificada Guariba e comercial Preto não ocorreu alteração significativa, já nas cultivares comerciais Branco e Verde o cozimento reduziu a fração biodisponível de magnésio em 30% e 10%, respectivamente.

Os resultados revelaram que as cultivares de feijão-caupi cozidas fornecem maior quantidade de minerais para absorção no trato gastrointestinal humano comparado àquelas de feijão comercial. Por exemplo, o cozimento promoveu aumento na biodisponibilidade de cobre, manganês e magnésio em sementes das cultivares biofortificadas do Aracê. De fato, o processo de melhoramento genético focado na biofortificação de Fe e Zn também é eficaz para promover a melhora da disponibilidade dos nutrientes minerais investigados neste estudo.

9.4 Composição centesimal e valor energético nos feijões crus

O processo de melhoramento genético tem promovido interferência sobre a composição química de sementes de novas cultivares de culturas estáveis (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008). Nesse sentido, a concentração de proteínas, lipídios, carboidratos, fenóis totais, cinza, umidade e ainda o valor energético foi determinada nas sementes das cultivares de feijão-caupi biofortificadas e não biofortificada bem como nas cultivares de feijão comercial. A Tabela 7 mostra os resultados. As cultivares de feijão-caupi apresentaram menor percentual de umidade em comparação aos de cultivares comerciais, com as biofortificadas Aracê, Tumucumaque e Xiquexique apresentando valores estatisticamente semelhantes e os menores entre as amostras analisadas.

Tabela 7: Concentrações obtidas (média \pm desvio padrão, n=3) para a composição centesimal e o valor energético em sementes cruas de cultivares de feijão-caupi e feijão comercial*.

Amostras	Umidade (%)	Cinza (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Valor Energético (kcal 100 g⁻¹)
ARA	8,4 \pm 0,3 ^a	3,9 \pm 0,1 ^a	27,1 \pm 1,5 ^a	3,0 \pm 0,2 ^a	58,6 \pm 2,1 ^{ad}	361,1 \pm 7,8 ^{ab}
TUM	8,6 \pm 0,3 ^a	3,5 \pm 0,1 ^b	26,3 \pm 0,0 ^b	1,3 \pm 0,0 ^b	60,9 \pm 1,1 ^{ab}	356,1 \pm 2,1 ^{ab}
XIQ	9,0 \pm 0,5 ^a	4,6 \pm 0,1 ^c	23,3 \pm 0,6 ^{cf}	1,8 \pm 0,0 ^c	63,9 \pm 2,1 ^b	365,2 \pm 11,4 ^b
GUA	10,5 \pm 0,6 ^b	3,2 \pm 0,1 ^d	24,7 \pm 0,2 ^d	1,0 \pm 0,0 ^d	61,9 \pm 1,4 ^{ab}	352,8 \pm 7,5 ^{abc}
BRA	12,4 \pm 0,2 ^c	3,0 \pm 0,1 ^e	28,1 \pm 1,1 ^a	1,5 \pm 0,1 ^e	55,7 \pm 0,4 ^c	342,0 \pm 4,0 ^{cf}
CAR	17,0 \pm 0,5 ^d	3,6 \pm 0,1 ^b	20,8 \pm 1,0 ^e	2,0 \pm 0,1 ^c	56,6 \pm 0,4 ^d	327,4 \pm 1,7 ^d
PRE	13,4 \pm 0,2 ^e	3,8 \pm 0,1 ^a	21,8 \pm 0,9 ^{cef}	1,3 \pm 0,0 ^b	60,1 \pm 0,5 ^{ad}	335,3 \pm 2,9 ^f
VER	11,0 \pm 0,5 ^b	3,3 \pm 0,1 ^d	23,9 \pm 1,1 ^{fd}	1,1 \pm 0,0 ^d	60,8 \pm 1,6 ^{ab}	348,2 \pm 2,4 ^{ace}

* Letra diferente na mesma coluna significa que as médias são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey (p < 0,05).

Dentro do grupo das cultivares de feijão-caupi também foi observado um valor médio menor das cultivares biofortificadas em relação a não biofortificada Guariba.

AVANZA *et al.*, (2013) e KAN *et al.*, (2018), também avaliaram cultivares de feijão-caupi e encontraram valores maiores do que os observados no presente trabalho. Por outro lado, as cultivares de feijão-caupi estudadas por NAIKER; GERRANO; MELLEM, (2019) apresentaram percentual de umidade similar, já as analisadas por FROTA; SOARES; ARÊAS, (2008) tiveram percentual menor que as cultivares biofortificadas avaliadas neste trabalho.

Considerando o percentual de cinzas, ocorreu uma variação de 3,2 a 4,6 entre as cultivares de feijão-caupi e de 3,0 a 3,8% nas cultivares comerciais, e com isso, os dois grupos, caupi e comercial, apresentaram valores semelhantes, já as cultivares de feijão-caupi biofortificadas foram maiores em relação a cultivar não biofortificada bem como superiores aos valores reportados em outros estudos (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; KAN *et al.*, 2018; NAIKER; GERRANO; MELLEM, 2019). Na cultivar biofortificada Xiquexique e comercial Branco foram obtidos o maior (5%) e menor (3%) percentual de cinza, respectivamente. Ressalta-se que uma maior concentração de cinzas pode ter relação com uma maior quantidade de óxidos metálicos indicando maior quantidade de minerais presentes nas cultivares de feijão-caupi biofortificadas.

O percentual de proteínas total em sementes das cultivares de feijão-caupi variou de 23% (Xiquexique) a 27% (Aracê), enquanto para as cultivares comerciais a variação foi de 21% (Carioca) a 28% (Branco). Assim, conforme teste Tukey ($p < 0,05$), não houve diferença significativa entre o percentual de proteína destes dois grupos. Para as cultivares de feijão-caupi, as biofortificadas Aracê e Tumucumaque apresentaram percentual proteico superior, já a biofortificada Xiquexique inferior, a não biofortificada Guariba.

Estudos anteriores têm demonstrado que as cultivares de feijão-caupi biofortificados apresentam percentual de proteínas total na faixa de 24,3% a 40,0% (AVANZA *et al.*, 2013; DAKORA; BELANE, 2020; FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; NAIKER; GERRANO; MELLEM, 2019). Em contrapartida, as cultivares de feijão-caupi avaliadas por KAN *et al.*, (2018) apresentaram concentração de proteína *ca.* 1,3 vezes menor que as cultivares de feijão-caupi biofortificadas.

Como pode ser visto na Tabela 7, a concentração de lipídios da cultivar Aracê biofortificada (3%) foi a maior e significativamente diferente à dos demais feijões conforme teste Tukey ($p < 0,05$). Todas as cultivares biofortificadas apresentaram concentração de lipídios superior a não biofortificada Guariba (1%). A média do grupo das cultivares comerciais foi semelhante a média da não biofortificada Guariba.

Considerando as comerciais, a cultivar Carioca apresentou maior concentração de lipídios (2,0%), sendo esta, significativamente superior as demais comerciais estudada e inferior apenas ao valor encontrado para a cultivar biofortificada Aracê. A concentração de lipídios nas cultivares estudadas por KAN *et al.*, (2018) variou de 4,2% a 5,6%. Uma alta concentração de lipídios consiste em um fator de qualidade nutricional do grão por proporcionar um possível aumento de substâncias como ácidos insaturados linoléico e oléico (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; LOVATO *et al.*, 2018).

A concentração carboidratos das sementes das cultivares de feijão-caupi variou de 59% (Aracê) a 64% (Xiquexique) e foi estatisticamente semelhante a das cultivares comerciais, que apresentou resultado variando de 56% (Branco) a 61% (Verde). Também não houve diferença entre as médias das biofortificadas (Aracê, Tumucumaque e Xiquexique), cultivares comerciais e da não biofortificada Guariba. No grupo das cultivares de feijão caupi só houve diferença entre a concentrações de carboidrato das biofortificadas Aracê e Xiquexique. AVANZA *et al.*, (2013) e FROTA; SOARES; ARÊAS, (2008) também avaliaram a concentração de carboidratos em sementes de algumas cultivares de feijão-caupi e encontraram valores inferiores aos das cultivares biofortificadas aqui estudadas.

O valor energético apresentado pela cultivar não biofortificada apresenta semelhança estatística a média das cultivares comerciais e das biofortificadas. Já as biofortificadas, em média, tiveram o valor energético superiores e significativamente diferente aos das cultivares de feijão-comerciais bem como à da cultivar feijão-caupi BRS-Milênio estudada por FROTA; SOARES; ARÊAS, (2008), indicando um aumento no valor energético com o processo de biofortificação e que as necessidades metabólicas do organismo humano podem ser atendidas com o consumo de uma menor porção das cultivares de feijão-caupi recém introduzidas pela Embrapa Meio-Norte.

9.5 Concentração de compostos fenólicos totais (CFT) nos feijões crus

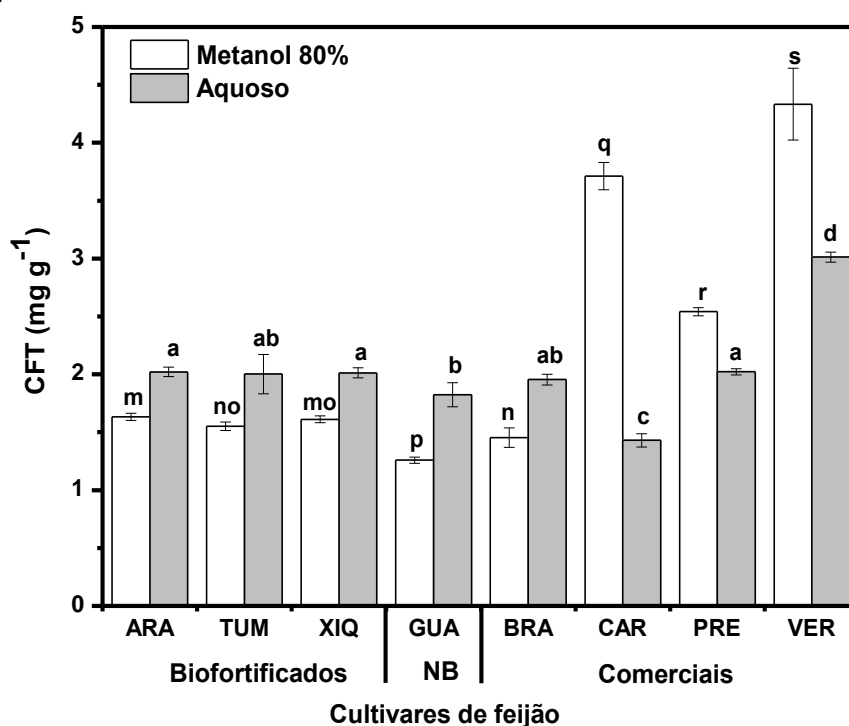
A Figura 25 apresenta a concentração de fenóis totais (CFT) em sementes das diferentes cultivares de feijão. A aplicação dos solventes extratores foi baseada em testes qualitativos preliminares realizados no laboratório. Considerando o extrato aquoso, a CFT variou de 1,4 (Carioca) a 3,0 mg g⁻¹ (Verde) nas cultivares comerciais, valores estes sendo o menor e maior entre as medidas analisadas. Para as cultivares de

feijão-caupi a variação foi de 1,8 (Guariba) a 2,0 mg g⁻¹ (Aracê), assim observa-se uma variação menor de CFT neste grupo de cultivares. No extrato aquoso observa-se ainda que as cultivares biofortificadas Aracê e Xiquexique apresentaram CFT superior à da cultivar não biofortificada Guariba.

Para a extração com metanol, CFT a maior variação também foi das cultivares comerciais com valores de 1,5 (Branco) a 4,3 mg g⁻¹ (Verde), já os CFT presente no extrato metanólico das cultivares de feijão-caupi variou de 1,3 (Guariba) a 1,6 mg g⁻¹ (Aracê). O resultado encontrado para a cultivar não biofortificada Guariba foi o menor entre as amostras analisadas, já o resultado da cultivar biofortificada Aracê, maior entre as cultivares de feijão-caupi, foi semelhante apenas a cultivar biofortificada Xiquexique.

O resultado obtido no extrato aquoso na cultivar biofortificada de feijão-caupi Tumucumaque foi superior a 177 ± 0,78 mg GAE (equivalente de ácido gálico)/100 g encontrado no extrato acetônico (80%) da mesma cultivar, analisado por MOREIRA-ARAÚJO *et al.*, (2017). Já no extrato aquoso da cultivar Xiquexique o resultado encontrado foi estatisticamente semelhante a 199,05 ± 1,98 mg GAE (equivalente de ácido gálico)/100 g relatado por MOREIRA-ARAÚJO *et al.*, (2018), após extração utilizando solução aquosa de acetona a 80%.

Figura 25: Valores encontrados (média ± desvio padrão, n=3) para a concentração* fenóis totais, em mg g⁻¹, em sementes cruas de cultivares de feijão-caupi e feijão comercial.



*Letras minúsculas iguais indica semelhança estatística entre as cultivares.

Os compostos fenólicos têm reconhecidas propriedades bioativas como atividade antioxidante e anticarcinogênica porém alguns compostos em alta concentração pode reduzir a absorção de nutrientes minerais devido a formação de complexo insolúveis nas condições gastrointestinal humana (DOMÍNGUEZ-AVILA *et al.*, 2017). Comparando os dois extratos, para as cultivares de feijão-caupi e na cultivar comercial Branco, o CFT em extrato aquoso foi superior ao CFT encontrado no extrato metanólico, já as cultivares comerciais, Carioca, Verde e Preto apresentou maior CFT no extrato metanólico.

Em termos percentuais a mudança para o extrato metanólico reduz em 19, 23, 20 e 31% o CFT nas cultivares biofortificadas Aracê, Tumucumaque, Xiquexique e não biofortificada Guariba, respectivamente. Estes resultados indicam que os compostos fenólicos presentes na matriz da maioria das cultivares são mais polares. Nas cultivares comerciais apenas a cultivar Branco teve uma redução de 26%, as demais apresentaram aumento no CFT de 26, 44 e 160% para Preto, Verde e Carioca, respectivamente. VALDÉS *et al.*, (2011) também reportaram a influência do solvente na concentração de fenóis totais de genótipos de feijão.

A literatura tem reportado uma relação entre a cor das sementes de feijão e seu perfil de compostos fenólico onde cultivares coloridos como Carioca, Verde e Preto apresentam alta concentração de flavonóides (ex. kaempferol) enquanto àquelas menos coloridas possuem ácidos fenólicos como compostos majoritários (MOKRANI; MADANI, 2016; STALIKAS, 2007). De fato, os ácidos fenólicos apresentam maior extractabilidade em água enquanto os flavonoides são melhores recuperados usando solventes orgânicos (LIN *et al.*, 2008; LOS *et al.*, 2019).

Como pode ser visto na Figura 25, dentro de cada grupo (comercial ou caupi), as cultivares de coloração escura, Carioca, Preto, Verde nos comerciais e a biofortificada Aracê nas cultivares de feijão-caupi, apresentaram os maiores valores de CTF corroborando com a correlação cor e concentração de compostos fenólicos (DE TOLEDO *et al.*, 2013; GANESAN; XU, 2017). Essa relação entre aspecto visual e composição química pode ser um parâmetro, mas ainda requer mais estudos.

9.6 Correlação e análise de componentes principais

O metabolismo de elementos em um tecido vegetal depende da relação intra- e interespecífica existentes na matriz. Então, o coeficiente de Pearson foi usado para avaliar a correlação da concentração total, bioacessível e biodisponível de cobre, manganês e magnésio com os outros constituintes estudados em sementes de feijão. Os valores estimados para os coeficientes de correlação de Pearson (r) estão mostrados na Tabela 8 no qual $r > 0,7$ com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Não foram observadas correlações significativas envolvendo a concentração total de ferro (Fe-T), cinza, compostos fenólicos presentes no extrato aquoso e a fração bioacessível de zinco e manganês.

Para o ferro, foram observadas correlações apenas envolvendo a fração bioacessível (Fe-A%), correlações estas com a fração biodisponível ($r = 0,871$, $p < 0,05$), concentração total de zinco ($r = 0,754$, $p < 0,05$), umidade ($r = -0,784$, $p < 0,05$) e valor energético ($r = 0,760$, $p < 0,05$). A correlação significativa entre as frações do mesmo elemento foi a única encontrada neste estudo. Já a correlação com o zinco indica mais um benefício de se biofortificar feijão também com zinco e não só apenas com o ferro. No caso do valor energético, este se correlacionou com a concentração de zinco total ($r = 0,841$, $p < 0,05$) e com umidade ($r = -0,958$, $p < 0,05$), com isso a redução da umidade no grão pode aumentar o valor energético e, conseqüentemente, aumentar a concentração total de zinco (Zn-T) e com as alterações nestes fatores ocorrer o aumento da fração bioacessível de ferro.

A correlação entre a concentração total de cobre com os demais componentes avaliados também foi baixa. Mas cabe destacar que a relação entre cobre e zinco ($r = -0,641$) e entre cobre total e o valor energético ($r = -0,739$, $p < 0,05$) são antagônicas. Essa correlação com o zinco é esperada, estes elementos competem por proteínas transportadores para captação e transporte em plantas superiores. Este fator pode ter limitado a quantidade de cobre em sementes das cultivares feijão-caupi biofortificados (AJEESH KRISHNA *et al.*, 2020).

A absorção de cobre no trato gastrointestinal apresentou uma razoável correlação positiva com a fração bioacessível ($r = 0,744$, $p < 0,05$) e biodisponível de magnésio ($r = 0,754$, $p < 0,05$). Esta correlação ainda não havia revelado por estudos ionômicos anteriores em matrizes vegetais (BAXTER, 2009).

Tabela 8: Valores dos coeficientes de Pearson para as correlações entre a composição centesimal, CFT, a concentração total (T) de Cu, Mn, Mg, Fe e Zn e as suas frações bioacessíveis (A%) e biodisponíveis (D%).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	Cu-T	1	-0,114	-0,360	-0,641	0,662	0,557	-0,161	0,070	-0,105	-0,609	-0,098	0,445	0,280	0,342	-0,591	0,619	-0,077	-0,351	-0,140	-0,440	-0,739[#]	-0,410	0,110
2	Mn-T		1	-0,403	0,610	0,238	0,114	-0,033	0,425	0,407	0,549	-0,088	-0,754[#]	-0,061	-0,736[#]	0,254	-0,472	0,080	0,678	0,752[#]	-0,286	0,407	-0,144	-0,520
3	Mg-T			1	0,363	-0,142	-0,226	-0,032	-0,853[#]	-0,380	0,122	-0,588	0,265	-0,783[#]	-0,210	0,179	-0,060	0,332	-0,520	-0,060	0,542	0,186	-0,031	0,311
4	Zn-T				1	0,038	-0,386	0,103	-0,115	-0,010	0,744[#]	-0,317	-0,630	-0,594	-0,849[#]	0,503	-0,811[#]	0,391	0,408	0,540	0,413	0,841[#]	0,147	-0,340
5	Fe-T					1	-0,008	-0,096	0,010	-0,213	-0,137	-0,247	0,138	-0,002	-0,164	-0,235	-0,083	0,396	-0,181	0,086	0,151	-0,049	-0,193	-0,219
6	Cu-A%						1	0,002	0,095	0,134	-0,317	-0,254	-0,006	-0,129	-0,015	-0,505	0,640	-0,524	0,016	0,136	-0,891[#]	-0,732[#]	-0,362	0,311
7	Mn-A%							1	0,514	0,305	0,551	0,508	-0,563	-0,110	0,138	0,421	-0,436	-0,634	0,566	-0,597	0,153	0,267	0,254	-0,334
8	Mg-A%								1	0,520	0,287	0,744[#]	-0,612	0,574	0,127	0,146	-0,295	-0,561	0,809[#]	-0,158	-0,327	0,115	0,232	-0,467
9	Zn-A%									1	0,545	0,390	-0,541	0,290	0,024	0,560	-0,063	-0,574	0,516	0,036	-0,306	0,008	-0,254	-0,497
10	Fe-A%										1	0,201	-0,855[#]	-0,275	-0,461	0,871[#]	-0,784[#]	-0,126	0,697	0,168	0,301	0,760[#]	-0,004	-0,680
11	Cu-D%											1	-0,276	0,754[#]	0,612	0,383	-0,218	-0,415	0,532	-0,497	0,027	0,170	0,117	-0,524
12	Mn-D%												1	0,141	0,526	-0,567	0,696	0,336	-0,939[#]	-0,279	0,103	-0,595	-0,113	0,586
13	Mg-D%													1	0,650	-0,014	0,196	-0,130	0,157	-0,211	-0,205	-0,199	-0,086	-0,324
14	Zn-D%														1	-0,084	0,492	-0,298	-0,293	-0,743[#]	-0,016	-0,471	-0,127	0,035
15	Fe-D%															1	-0,617	-0,013	0,466	0,003	0,442	0,685	-0,205	-0,761[#]
16	Umidade																1	-0,223	-0,617	-0,121	-0,593	-0,958[#]	-0,387	0,560
17	Cinza																	1	-0,407	0,470	0,510	0,377	-0,149	-0,084
18	Proteína																		1	0,166	-0,204	0,507	0,158	-0,609
19	Lipídios																			1	-0,295	0,217	-0,320	-0,146
20	Carboidratos																				1	0,653	0,321	-0,178
21	V.E.																					1	0,287	-0,551
22	CFT ¹																						1	0,407
23	CFT ²																							1

[#]Correlações com $p < 0,05$; ¹extrato aquoso; ²extrato metanólico.

A concentração de proteína também apresentou correlação positiva com a fração bioacessível de magnésio ($r = 0,809$, $p < 0,05$). Porém, os coeficientes de Pearson foram negativos para a correlação entre a concentração total de magnésio com suas frações bioacessível ($r = -0,853$, $p < 0,05$) e biodisponível ($r = -0,783$, $p < 0,05$), demonstrando que o aumento na captação de magnésio está associado com outros componentes da matriz da semente de feijão como o cobre e proteína. Ao contrário, a bioacessibilidade de cobre apresentou uma correlação negativa com o percentual de carboidratos ($r = -0,891$, $p < 0,05$). Estudos reportam que carboidratos interagem fortemente com o cobre reduzindo sua absorção e induzindo sua deficiência agravando a crise metabólica em pacientes com patologias relacionadas ao metabolismo do micronutriente (SONG; VOS; MCCLAIN, 2018).

O coeficiente de Pearson foi significativo e negativo para a correlação da concentração total de manganês com a sua fração biodisponível ($r = -0,754$, $p < 0,05$), indicando que a absorção de manganês fornecido pelo feijão sofre interferência de outros fatores nutricionais. De fato, a correlação entre a disponibilidade de manganês com ferro bioacessível e o percentual de proteínas também foram significativas e negativas, $r = -0,855$ e $-0,939$, respectivamente ($p < 0,05$). O efeito antinutricional de proteínas e ferro sobre a absorção de Mn de alimentos vegetais é pouco conhecido o qual Ca, fibras e fitatos são os componentes mais comuns por promover a redução fração solúvel disponível do micronutriente para absorção no trato intestinal humano devido os complexos insolúveis formados (NOSRATPOUR; JAFARI, 2018).

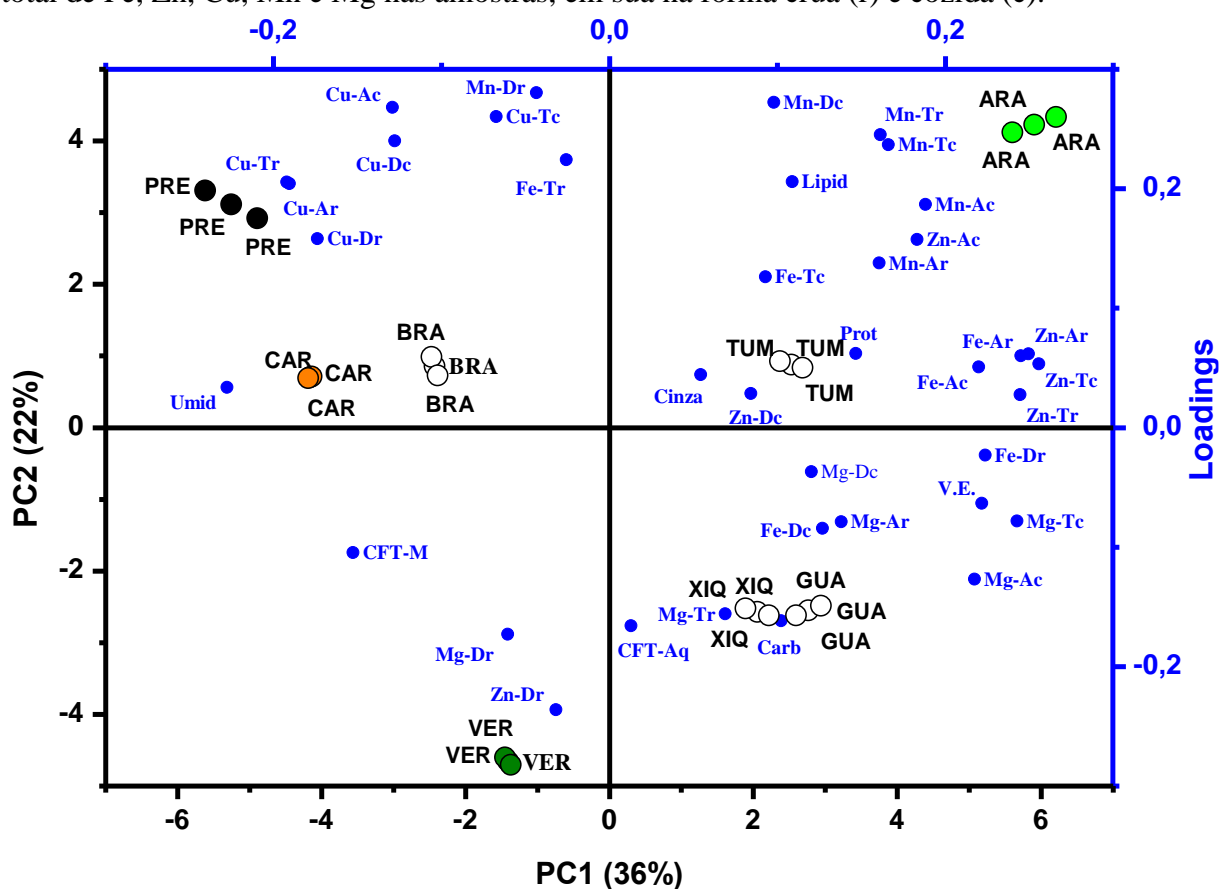
A correlação entre a fração biodisponível de zinco e concentração total deste elemento ($r = -0,849$, $p < 0,05$), com a concentração de lipídios ($r = -0,743$, $p < 0,05$) e com a concentração total de manganês ($r = -0,736$, $p < 0,05$) revelou valores significativos negativos. Este achado pode colaborar para eficiência do processo de biofortificação indicando um impedimento na produção de culturas com alta concentração de zinco e manganês e que a redução da concentração de lipídios pode levar a uma melhoria na biodisponibilidade de zinco. Ao contrário, a correlação entre a concentração de manganês e lipídios apresentou coeficiente de Pearson positivo ($r = 0,752$, $p < 0,05$). Esse comportamento pode ser específico do feijão, pois MOREDA *et al.*, (2016) avaliaram a biodisponibilidade de manganês em nozes e sementes *in natura*, e não observaram interação com os lipídios.

Como pode ser visto na Tabela 8, a correlação do CFT para ambos os extratos com os nutrientes minerais e suas frações foram baixos, exceto para a fração de ferro biodisponível, onde ocorreu uma correlação de $-0,761$ ($p < 0,05$) com os CFT do extrato metanólico. Esse

resultado indica que os compostos fenólicos polares das sementes de feijão apesar de se apresentar como fatores nutricionais e bioativos (DOMÍNGUEZ-AVILA *et al.*, 2017) podem diminuir a fração de ferro absorvido pelo trato gastrointestinal.

Para ampliar as informações das correlações observadas, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada usando um conjunto de dados que reuniu as variáveis estudadas aqui para as oito cultivares de feijão e a inclusão da concentração total, bioacessível e biodisponível de ferro e zinco reportadas por COELHO *et al.*, (2021), pois as matrizes de feijão foram as mesmas (CORRADI *et al.*, 2020; GRANATO *et al.*, 2018). As quatro componentes podem explicar 83,0% da variância total no qual a PC1 e PC2 descrevem 36,0% e 22,0%, respectivamente. A Figura 26 mostra o gráfico de escores e loadings para PC1 vs PC2. Considerando a PC1 (Figura 26), foi possível observar a discriminação entre as cultivares de feijão-caupi e comercial.

Figura 26: Gráfico de PC1 vs PC2 com escores (eixo preto) e loadings (eixo azul) considerando os fatores nutricionais avaliados nas sementes cultivares de feijão cruas e cozidas. As letras A, D e T referem-se às concentrações bioacessíveis e biodisponíveis e ao total de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg nas amostras, em sua na forma crua (r) e cozida (c).



O escore positivo em PC1 para as cultivares de feijão-caupi pode ser atribuído ao efeito da biofortificação que aumentou a concentração total de zinco (Zn-Tr e Zn-Tc) e magnésio (Mg-Tc) bem como a bioacessibilidade de ferro (Fe-Ar) e zinco (Zn-Ar) comparado aos feijões comerciais (ver Tabela 9).

Para a cultivar biofortificada Aracê, a maior concentração destas variáveis, com as variáveis que influenciam de forma positiva na PC2 ajudam a diferir esta cultivar das demais estudadas, comercial e caupi. Entre os componentes majoritários, é observado que a umidade é a variável que influencia de forma mais negativa na PC1, deslocando para a esquerda do gráfico as amostras com maiores valores nesta variável, no caso, as cultivares comerciais. A PC2 revelou uma distinção entre as cultivares de feijão-caupi, deixando as cultivares biofortificadas Tumucumaque e Aracê em um quadrante (lado positivo da PC2) e a biofortificada Xiquexique e não biofortificada Guariba em outro (lado negativo da PC2).

Isto é resultante da interação entre os fatores cozimento e biofortificação o qual elevaram a disponibilidade de manganês (Mn-Dc e Mn-Dr), da concentração total (Cu-Tc) e bioacessível (Cu-Ac) de cobre nas cultivares biofortificadas Aracê e Tumucumaque em relação a biofortificada Xiquexique e não biofortificada Guariba. A concentração de zinco biodisponível da semente crua (Zn-Dr), variável que mais influência de forma negativa na PC2 distingue a cultivar comercial Verde das demais comerciais.

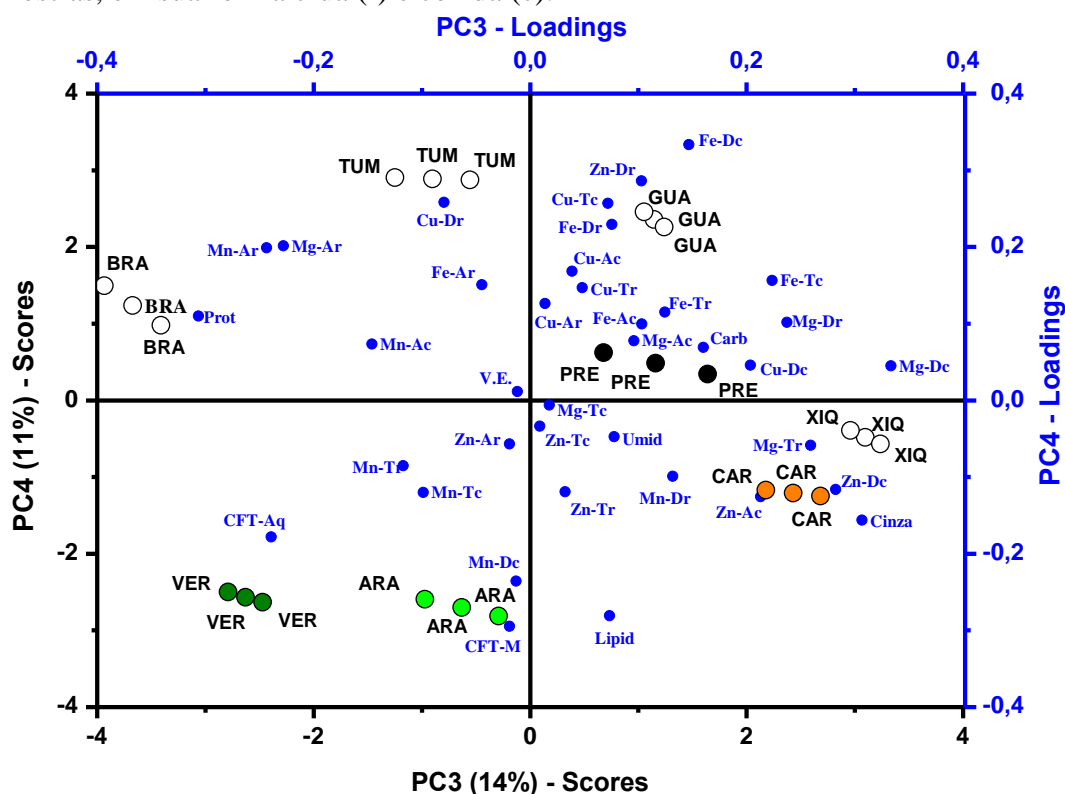
Tabela 9: Loadings dos fatores nutricionais avaliados para os quatro componentes principais.

Fatores nutricionais*	Loadings			
	PC1 (36%)	PC2 (22%)	PC3 (14%)	PC4 (11%)
Carboidrato (Carb)	0,102	-0,162	0,160	0,069
CFT-Aquoso (CFT-Aq)	0,013	-0,166	-0,239	-0,178
CFT-Metanol 80% (CFT-M)	-0,153	-0,105	-0,019	-0,295
Cinza	0,054	0,044	0,307	-0,156
Cu-Ac	-0,129	0,268	0,039	0,168
Cu-Ar	-0,192	0,206	0,014	0,126
Cu-Dc	-0,128	0,240	0,204	0,046
Cu-Dr	-0,174	0,158	-0,080	0,258
Cu-Tc	-0,067	0,260	0,072	0,257
Cu-Tr	-0,191	0,204	0,048	0,147
Fe-Ac	0,220	0,051	0,103	0,100
Fe-Ar	0,245	0,060	-0,045	0,151
Fe-Dc	0,127	-0,084	0,147	0,334
Fe-Dr	0,224	-0,023	0,075	0,229
Fe-Tc	0,093	0,126	0,224	0,156
Fe-Tr	-0,026	0,224	0,125	0,115
Lipídios (Lipid)	0,109	0,206	0,073	-0,281
Mg-Ac	0,217	-0,127	0,096	0,077
Mg-Ar	0,138	-0,079	-0,228	0,201
Mg-Dc	0,120	-0,037	0,333	0,045
Mg-Dr	-0,060	-0,173	0,237	0,102
Mg-Tc	0,243	-0,078	0,018	-0,006
Mg-Tr	0,069	-0,156	0,259	-0,059
Mn-Ac	0,188	0,187	-0,146	0,073
Mn-Ar	0,161	0,138	-0,244	0,199
Mn-Dc	0,098	0,272	-0,013	-0,236
Mn-Dr	-0,043	0,280	0,132	-0,099
Mn-Tc	0,166	0,237	-0,099	-0,120
Mn-Tr	0,161	0,245	-0,117	-0,085
Proteína (prot)	0,147	0,062	-0,306	0,110
Umidade (umid)	-0,228	0,034	0,078	-0,047
Valor energético (V.E.)	0,222	-0,063	-0,012	0,011
Zn-Ac	0,183	0,158	0,213	-0,126
Zn-Ar	0,250	0,062	-0,019	-0,057
Zn-Dc	0,084	0,029	0,282	-0,116
Zn-Dr	-0,032	-0,236	0,103	0,286
Zn-Tc	0,256	0,053	0,009	-0,034
Zn-Tr	0,245	0,028	0,032	-0,119

*As letras A D e T refere-se as concentrações bioacessíveis, biodisponíveis e total de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg nas amostras na forma crua (r) e cozida (c).

A concentração biodisponível de zinco (Zn-Dc) e magnésio (Mg-Dc) nos feijões cozidos e a concentração de cinza foi o que mais influenciou no lado positivo, já a concentração de proteína no lado negativo da componente principal 3 (PC3). Observa-se na Figura 27, que essas variáveis contribuem na distinção da cultivar biofortificada Xiquexique (lado positivo), principalmente em relação as demais cultivares biofortificadas Aracê e Tumucumaque (lado negativo). Essas variáveis também indicam uma similaridade das cultivares Aracê e Tumucumaque. Entre os comerciais, a cultivar Branco, por apresentar elevada concentração de proteína, fica mais do lado negativo da PC3 e difere, principalmente, das cultivares comerciais Preto e Carioca, que ficaram do lado positivo.

Figura 27: Gráfico de PC3 vs PC4 com escores e loadings considerando os fatores nutricionais avaliados nas sementes cultivares de feijão cruas e cozidas. As letras A, D e T referem-se às concentrações bioacessíveis e biodisponíveis e ao total de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg nas amostras, em sua forma crua (r) e cozida (c).



Para a componente principal 4 (PC4), observa-se que a concentração biodisponível de ferro nos feijões cozidos (Fe-Dc) e de zinco nos feijões cru (Zn-Dr) faz as cultivares biofortificadas Tumucumaque e não biofortificada Guariba serem mais similares que as demais cultivares de feijão-caupi. A concentração de lipídios e compostos fenólicos totais presente no extrato metanólico (CFT-M) influenciaram de forma negativa na PC4 sendo que a

concentração de lipídios foi outra variável que fez a cultivar biofortificada Aracê diferir das demais sementes de feijão-caupi, já a CFT mais elevada no extrato metanólico nas cultivares comerciais Verde e Carioca o difere das demais sementes de feijão estudada.

Com isso das 38 variáveis estudadas, 17 foram as que mais tiveram importância na análise de componentes principais. Destas 17 (dezessete), envolvia, além de cinza, proteínas, lipídios e compostos fenólicos presente no extrato metanólico, 2 o nutriente ferro, 5 o zinco, 2 de cobre, manganês e magnésio. Com isso observa-se que a composição centesimal possui um grau de importância na classificação de sementes de feijão e que o processo de biofortificação está possibilitando a distinção entre cultivares biofortificadas e não biofortificadas.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração de manganês nas sementes das cultivares de feijão-caupi biofortificadas foi significativamente superior a de feijão comercial enquanto a bioacessibilidade foi *ca.* 51,6% maior. Também a concentração de magnésio das cultivares de feijão-caupi foi maior, alcançando uma bioacessibilidade e biodisponibilidade superior a 50,0% e 21,0%, respectivamente. Os níveis de cobre foram pouco sensíveis aos efeitos da biofortificação.

O cozimento modificou a concentração de cobre, manganês e magnésio das sementes das cultivares de feijão-caupi. Ao contrário, a bioacessibilidade e biodisponibilidade dos minerais em sementes cozidas das cultivares de feijão-caupi foi aumentada significativamente comparada às amostras cruas.

Os destaques, avaliando a composição centesimal, consiste na alta concentração de lipídios e valor energético apresentado pelas sementes de feijão-caupi. A aplicação de diferentes solventes para extração de compostos fenólicos possibilitou verificar que as sementes feijões são constituídas de espécies mais polares. Investigando a interação entre os fatores nutricionais estudados, verificou-se uma correlação ionômica desconhecida entre cobre e magnésio bem como uma correlação sinérgica entre a concentração de manganês e lipídios.

Foi observado correlações antagônicas de cobre e manganês com zinco o que pode ser considerado um fator limitante para o aumento da concentração dos micronutrientes nas sementes de cultivares de feijão-caupi biofortificados. A PC1 foi suficiente para discriminar as cultivares de feijão-caupi e feijão comercial baseado nos altos loadings apresentados para a concentração de zinco e ferro indicando que os efeitos da biofortificação são superiores ao de outros fatores, *ex.* cozimento. Então, os dados mostram que os efeitos benéficos da biofortificação de cultivares de feijão-caupi recém introduzidas pela Embrapa estão além daqueles reportados por Coelho *et al.*, (2021).

11 CONCLUSÃO

O consumo destes feijões-caupi biofortificados tem potencial para reverter a deficiência e/ou contribuir para manutenção da homeostase dos micronutrientes na dieta humana considerando o papel crucial destes nutrientes para as funções vitais, ex. imunidade inata.

No entanto, mais estudos devem ser feitos no sentido de identificar e caracterizar biomoléculas, como metaloproteínas, para aprofundar a compreensão da interação dos micronutrientes em sementes de feijão-caupi e avaliar o efeito da cocção nestas metaloproteínas.

Além disso, sugere-se avaliar o efeito da biofortificação na composição de substâncias que promovem ou inibem a biodisponibilidade de ferro e zinco e ainda identificar e classificar feijões com base na composição de compostos fenólicos presentes nas sementes.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, J. C. Manganese in Brazil: Discovery, extraction, consumption and marketing from a historical perspective. **Química Nova**, v. 42, n. 10, p. 1172–1183, 1 out. 2019.
- AGATEMOR, C.; BEAUCHEMIN, D. Analytica Chimica Acta Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 66–83, 2011.
- AJEESH KRISHNA, T. P. *et al.* Structure, Function, Regulation and Phylogenetic Relationship of ZIP Family Transporters of Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. May, p. 1–18, 2020.
- ALSALEEM, B. *et al.* Use of oral iron in managing iron deficiency anemia in children with intestinal failure. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 8, 1 dez. 2021.
- ANASTASSOPOULOU, J.; THEOPHANIDES, T. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 79–91, 2002.
- ANVISA. RDC 269/2005: Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 6, 2005.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official Methods of Analysis**. 17th ed. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC, 2005.
- ARAGÃO, A.; CONTINI, E. **O agro no Brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020**. EMBRAPA, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf/41e20155-5cd9-f4ad-7119-945e147396cb>>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- AVANZA, M. *et al.* Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 148–157, 2013.
- BALCAEN, L. *et al.* Analytica Chimica Acta Inductively coupled plasma e Tandem mass spectrometry (ICP-MS / MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra) trace elements e A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 894, p. 7–19, 2015.
- BARAN, E. J. Suplementação de elementos-traços. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 7–12, 2005.
- BARROS, N. V. DOS A. *et al.* Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5, p. 824–831, 2017.
- BAXTER, I. Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 381–386, 2009.

BECK, K. L. *et al.* Micronutrients and athletic performance: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 158, p. 112618, 1 dez. 2021.

BECKER, J. S. Trace and ultratrace analysis in liquids by atomic spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3 SPEC. ISS., p. 243–254, 2005.

BISHOP, D. P. *et al.* Determination of selenium in serum in the presence of gadolinium with ICP-QQQ-MS. p. 2842–2846, 2015.

BOUIS, H. E. *et al.* Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 32, n. 1 SUPPL., p. 31–40, 2011.

BRASIL. Lei Nº 9.456, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. 1997, p. 1–12.

BRASIL. Instrução normativa nº 12, de março de 2008. Regulamento Técnico do feijão. 2008, p. 1–16.

BUENO, L. Efeito do triacilglicerídeo de cadeia média, da fibra e do cálcio na disponibilidade de magnésio e de zinco pelo método *in vitro* e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 306–311, 2008.

CARBAS, B. *et al.* Comparison of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for the determination of nutritional and antinutritional parameters in common beans. **Food Chemistry**, v. 306, p. 125509, 2020.

CARDOSO, B. R.; GANIO, K.; ROBERTS, B. R. Expanding beyond ICP-MS to better understand selenium biochemistry. **Metallomics**, p. 1974–1983, 2019.

CARVALHO, L. M. J. *et al.* Iron and zinc retention in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) after home cooking. **Food and Nutrition Research**, v. 56, 2012.

CÉLIA CRAVEIRO *et al.* **Leguminosa a leguminosa, encha o seu prato de saúde**. [s.l.] Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2016.

COBINE, P. A.; MOORE, S. A.; LEARY, S. C. Getting out what you put in: Copper in mitochondria and its impacts on human disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1868, n. 1, p. 118867, 2021.

COELHO, R. C. *et al.* Expanding information on the bioaccessibility and bioavailability of iron and zinc in biofortified cowpea seeds. **Food Chemistry**, v. 347, n. January, p. 129027, 2021.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. n. 6. Brasília, DF, v. 09, mar 2022. ISSN: 23186852 Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos>>. Acesso em: 15 mar. 2022.

CONTINI, M. *et al.* Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. **Food Chemistry**, v. 110, p. 659–669, 2008.

CORAZZA, G. *et al.* Analytica Chimica Acta External calibration strategy for trace element quantification in botanical samples by LA-ICP-MS using filter paper. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 51–57, 2016.

CORRADI, E. *et al.* An objective, principal-component-analysis (PCA) based, method which improves the quartz-crystal-microbalance (QCM) sensing performance. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 315, p. 112323, 2020.

COSTA, A. F. DA. **Feijão-caupi no semiárido Brasileiro**. Recife: UFRPE, 2020. v. v. 3, n.3
COUTINHO, P. W. R. *et al.* Doses de fósforo na cultura do feijão-caupi na região nordeste do Estado do Pará. **Revista Agro@Mambiente on-Line**, v. 8, n. 1, p. 66, 2014.

DAKORA, F. D.; BELANE, A. K. Evaluation of Protein and Micronutrient Levels in Edible Cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp.). **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. September 2019, p. 1–10, 2020.

DALCORSO, G.; MANARA, A.; FURINI, A. An overview of heavy metal challenge in plants: From roots to shoots. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1117–1132, 2013.

DE OLIVEIRA, A. P.; NAOZUKA, J. Effects of iron enrichment of adzuki bean (*Vigna angularis*) sprouts on elemental translocation, concentrations of proteins, distribution of Fe-metalloproteins, and Fe bioaccessibility. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 10, p. 1937–1946, 2017.

DE TOLEDO, N. M. V. *et al.* Interaction and digestibility of phaseolin/polyphenol in the common bean. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 776–780, 2013.

DIAS-BARBOSA, C. Z. DE M. C. *et al.* Seleção de linhagens elite de feijão-caupi de porte semiereto biofortificadas com ferro e zinco. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19807–19814, 2020.

DÍAZ-GÓMEZ, J. *et al.* **Biofortification of crops with nutrients: factors affecting utilization and storage** **Current Opinion in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2017.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. *et al.* Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. **Food and Function**, v. 8, n. 1, p. 15–38, 2017.

DUFAILY, V.; NOËL, L.; GUÉRIN, T. Determination of chromium, iron and selenium in foodstuffs of animal origin by collision cell technology, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), after closed vessel microwave digestion. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, n. 2, p. 214–221, 21 abr. 2006.

DUFAILY, V.; NOËL, L.; GUÉRIN, T. Optimisation and critical evaluation of a collision cell technology ICP-MS system for the determination of arsenic in foodstuffs of animal origin. **Anal Chim Acta**, v. 1, p. 134–142, 2008.

EPA. **Manganese (CASRN 7439-96-5) / IRIS / US EPA**. 1995. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0373_summary.pdf>. Acesso em: 15 maio. 2022.

FABBRI, A. D. T.; CROSBY, G. A. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 3, p. 2–11, 2016.

FAO. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2021**. Rome: FAO, 2021.

FEITEIRA, F. N.; DE BARREIROS, J. V. P. P.; PACHECO, W. F. Use of a flatbed scanner and polyurethane foam for quantification of total iron in food supplements. **Química Nova**, v. 44, n. 1, p. 20–27, 2021.

FEITOSA, S. *et al.* Effect of traditional household processes on iron, zinc and copper bioaccessibility in black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Foods**, v. 7, n. 8, p. 1–12, 2018.

FERNANDES, K. G. *et al.* Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. **Quim. Nova**, v. 26, n. 2, p. 249–252, 2003.

FIGUEIREDO, M. A. DE *et al.* Zinc and selenium accumulation and their effect on iron bioavailability in common bean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 111, p. 193–202, 2017.

FISBERG, M. *et al.* Consenso Sobre Anemia Ferropriva. **Sociedade Brasileira de Pediatria**, n. 2, p. 1–13, 2018.

FONTENELE, A. *et al.* Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 81–88, 2012.

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

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

GANESAN, K.; XU, B. Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

GERRANO, A. S. *et al.* Selection of cowpea genotypes based on grain mineral and total protein content. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 69, n. 2, p. 155–166, 2019.

GIUBERTI, G. *et al.* Nutrients and Antinutrients Seed Content in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Lines Carrying Mutations Affecting Seed Composition. **agronomy**, v. 9, n. 317, p. 1–24, 2019.

GRANATO, D. *et al.* Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v. 72, n. October 2017, p. 83–90, 2018.

GULATI, P.; ROSE, D. J. Effect of extrusion on folic acid concentration and mineral element dialyzability in Great Northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 269, n. June, p. 118–124, 2018.

HAAS, J. D. *et al.* Consuming iron biofortified beans increases iron status in rwandan women after 128 days in a randomized controlled feeding trial. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 8, p. 1586–1592, 1 ago. 2016.

HARVESTPLUS. **BIOFORTIFICATION: A food-systems approach to ensuring healthy diets globally**. Fev, 2022. Disponível em: < https://agroavances.com/img/publicacion_documentos/WFP_HarvestPlus.pdf >. Acesso em: 14 mar. 2022.

HEMALATHA, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of heat processing on the bioaccessibility of zinc and iron from cereals and pulses consumed in India. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, n. 1, p. 1–7, 2007.

HOFFMANN, F.; KOELLNER, T.; KASTNER, T. The micronutrient content of the European Union's agricultural trade. **Ecological Economics**, v. 188, 1 out. 2021.

HOPPLER, M. *et al.* Iron Speciation in Beans (*Phaseolus vulgaris*) Biofortified by Common Breeding. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 9, p. C1629–C1634, 2014.

HUERTAS, R. *et al.* Iron and zinc bioavailability in common bean (*Phaseolus vulgaris*) is dependent on chemical composition and cooking method. **Food Chemistry**, v. 387, p. 132900, set. 2022.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020.

ILIO, S. D. *et al.* Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: still a challenge? A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 698, n. 1–2, p. 6–13, 2011.

IOM, N. A. OF S. E. AND MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for sodium and potassium**. Washington: DC: The National Academies Press, 2019.

JÚNIOR, C. A. L. *et al.* Expanding the information about the influence of cadmium on the metabolism of sunflowers: Evaluation of total, bioavailable, and bioaccessible content and metallobiomolecules in sunflower seeds. **Environmental and Experimental Botany**, v. 125, p. 87–97, 2016.

JÚNIOR, J. B. F. M. O feijão comum. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 1–22, 1960.

KAFAOGLU, B. *et al.* Determination and evaluation of element bioaccessibility in some nuts and seeds by in-vitro gastro-intestinal method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 58–65, 2016.

KAN, L. *et al.* Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. **Food Chemistry**, v. 260, n. December 2017, p. 317–326, 2018.

KATUURAMU, D. N. *et al.* Genome-wide association analysis of nutritional composition-related traits and iron bioavailability in cooked dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 38, n. 4, 2018.

KERO, A. F. A.; MOORE, L. R.; MALSON, J. Fundamental Studies Related to Elemental Isotope Selection for Quantitative Analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) with a Helium Collision Cell. **Spectroscopy**, v. 27, n. 6, 2012.

KHATIBZADEH, S. *et al.* A global database of food and nutrient consumption. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 12, p. 931–934, 2016.

KUANG, X. *et al.* Magnesium in joint health and osteoarthritis. **Nutrition Research**, v. 90, p. 24–35, 1 jun. 2021.

KUMAR, S. *et al.* Crop biofortification for iron (Fe), zinc (Zn) and vitamin A with transgenic approaches. **Heliyon**, v. 5, n. 6, 1 jun. 2019.

KUMAR, S.; PANDEY, G. Biofortification of pulses and legumes to enhance nutrition. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. 4–9, 2020.

KUMARI, M.; PLATEL, K. Bioaccessibility of trace elements and chromium speciation in commonly consumed cereals and pulses. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 7, p. 1612–1620, 2017.

LAPARRA, J. M.; GLAHN, R. P.; MILLER, D. D. Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and iron (Fe) availability to Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10999–11005, 2008.

LIN, L. Z. *et al.* The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 399–410, 2008.

LINKS, D. A. Optimisation of DRC ICP-MS for determining selenium in plants. **J. Anal. No. Espectro.**, v. 26, p. 1756–1762, 2011.

LOS, F. G. B. *et al.* Extraction Optimization of Phenolic Extracts from Carioca Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Using Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 148–159, 2019.

LOVATO, F. *et al.* Composição centesimal e conteúdo mineral de diferentes cultivares de feijão biorfortificado (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 1, p. 79–87, 2004.

MEYER, M. R. M. *et al.* Content of zinc, iron and their absorption inhibitors in Nicaraguan common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 87–93, 2013.

MARTINS, V. *et al.* Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of selenium toxicity in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, n. December 2017, p. 172–182, 2018.

MATOS-REYES, M. N. *et al.* Total content of As, Sb, Se, Te and Bi in Spanish vegetables, cereals and pulses and estimation of the contribution of these foods to the Mediterranean daily intake of trace elements. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 188–194, 2010.

MAY, T. W.; WIEDMEYER, R. H. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, v. 19, n. 5, p. 150–155, 1998.

MENEZES, E. A. *et al.* Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, and crude protein in beef, pork and chicken after thermal processing. **Food Chemistry**, v. 240, n. March 2017, p. 75–83, 2018.

MESQUITA, F. R. *et al.* Linhagens de feijão (*phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114–1121, 2007.

MINGRONI, T. T. *et al.* In vitro Evaluation of Ca, Cu, and Mg Bioaccessibility in Fresh and Dried Fruits. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 00, n. 1, p. 1–8, 2018.

MOHANTY, C. S.; SINGH, V.; CHAPMAN, M. A. Winged bean: An underutilized tropical legume on the path of improvement, to help mitigate food and nutrition security. **Scientia Horticulturae**, v. 260, p. 108789, 27 jan. 2020.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68–76, 2016.

MONÇÃO, N. B. N. *et al.* Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* stem bark: Possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpiniiifolia* on human tumour cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4204–4224, 2015.

MOREDA, J. *et al.* In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. v. 30, n. 2, 2011.

MOREDA, J. *et al.* Bioavailability assessment of essential and toxic metals in edible nuts and seeds. **Food Chemistry**, v. 205, p. 146–154, 2016.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. *et al.* Identification and quantification of antioxidant compounds in cowpea. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5, p. 799–805, 2017.

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

NAIKER, T. S.; GERRANO, A.; MELLEM, J. Physicochemical properties of flour produced from different cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars of Southern African origin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 1541–1550, 2019.

NELSON, J.; LOPEZ-LINARES, F. Determination of chloride in crude oils by direct dilution using inductively coupled plasma tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). **J. Anal. At. Spectrom**, v. 34, p. 1433–1438, 2019.

NEVES, D. S. C.; SOUZA, A. S.; DE LEMOS, L. R. Multivariate optimization of an aqueous two-phase extraction for determination of cadmium and manganese in food sample. **Microchemical Journal**, v. 159, n. June, p. 105458, 2020.

NOSRATPOUR, M.; JAFARI, S. M. Bioavailability of minerals (Ca, Mg, Zn, K, Mn, Se) in food products. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 148–154.

OKWUONU, I. C. *et al.* Opportunities and challenges for biofortification of cassava to address iron and zinc deficiency in Nigeria. **Global Food Security**, v. 28, 1 mar. 2021.

OLIVEIRA, S. R. *et al.* In vitro gastrointestinal digestion to evaluate the total, bioaccessible and bioavailable concentrations of iron and manganese in açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulps. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 53, n. January, p. 27–33, 2019.

OMS. **Global anaemia reduction efforts among women of reproductive age: impact, achievement of targets and the way forward for optimizing efforts**. Geneva: World Health Organization, 2020.

PACHÓN, H. *et al.* Iron, zinc, and protein bioavailability proxy measures of meals prepared with nutritionally enhanced beans and maize. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, 2009.

PANIZ, F. P. *et al.* Effective procedures for the determination of As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Th, Zn, U and rare earth elements in plants and foodstuffs. **Analytical Methods**, v. 10, n. 33, p. 4094–4103, 7 set. 2018.

PEIXOTO, E. M. A. Magnésio. **Química Nova na Escola**, n. 12, 2000.

PEREIRA, A. M. *et al.* Evaluation of total and bioaccessible concentration of minerals in creole beans. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 94, n. April, 2020a.

PEREIRA, A. M. P. T. *et al.* Exposure to nickel through commercial premade baby foods: Is there any risk? **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, 1 set. 2020b.

PEREIRA, C. C. *et al.* Evaluation of the bioaccessibility of minerals from blackberries, raspberries, blueberries and strawberries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 73–78, 2018.

PEREIRA, E. J. *et al.* Effects of cooking methods on the iron and zinc contents in cowpea (*Vigna unguiculata*) to combat nutritional deficiencies in Brazil. **Food and Nutrition Research**, v. 58, 2014.

PEREIRA, E. J. *et al.* Effect of different home-cooking Methods on the bioaccessibility of zinc and iron in conventionally bred cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) consumed in Brazil. **Food and Nutrition Research**, v. 60, 2016.

PEREIRA, M. P.; TAVANO, O. L. Use of Different Spices as Potential Natural Antioxidant Additives on Cooked Beans (*Phaseolus vulgaris*). Increase of DPPH Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 337–343, 2014.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. *et al.* Classification of cowpea beans using multielemental fingerprinting combined with supervised learning. **Food Control**, v. 95, n. July 2018, p. 232–241, 2019.

PHILLIPS, R. D. Cowpea Processing and Products. **Dry Beans and Pulses Production, Processing and Nutrition**, p. 235–259, 2013.

PICK, D.; LEITERER, M.; EINAX, J. W. Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 315–319, jul. 2010.

PINTO, E.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. **Journal of Plant Physiology**, v. 179, p. 64–82, 2015.

RAES, K. *et al.* Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and anti-nutritional factors in the plant. **Trends in Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 32–41, 2014.

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

REIS, M. S.; SILVA, M. A. A. P. DA S. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 1, p. 5–19, jan. 1999.

RIBEIRO, N. D.; KLÄSENER, G. R. Physical quality and mineral composition of new Mesoamerican bean lines developed for cultivation in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 89, n. November 2019, p. 103479, 2020.

ROCHA, R. A. DA; AFONSO, J. C. MANGANÊS. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 2, p. 103–105, 2012.

ROCHA, M. DE M. *et al.* **Feijão-caupi: Melhoramento genético para o avanço da cultura**. Teresina-PI: EMBRAPA Meio Norte, fev. 2016. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144703/1/FeijaoCaupiAvancoCultura2016.pdf> >. Acesso em: 07 de jan. de 2022.

RODUSHKIN, I. *et al.* Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market. **Science of the Total Environment**, v. 392, n. 2–3, p. 290–304, 2008.

SAMANTA, S. *et al.* Determination of trace metal (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Co, Cd and Pb) concentrations in seawater using single quadrupole icp-ms: A comparison between offline and online preconcentration setups. **Minerals**, v. 11, n. 11, 1 nov. 2021.

SANITÀ DI TOPPI, L.; THOMINE, S. Virtual special issue on: “Positive and negative impact of metal(loid)s in plant physiology and biochemistry: Basic and applied aspects.” **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 162, p. 137–138, 2021.

SANTOS, W. P. C. *et al.* Bioaccessibility assessment of toxic and essential elements in produced pulses, Bahia, Brazil. **Food Chemistry**, v. 240, p. 112–122, 2018.

SARGENTELLI, V.; M. A. E.; M. A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no Homem. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 290–293, 1996.

SEVERO, J. S. *et al.* Aspectos metabólicos e nutricionais do magnésio. **Nutricion Clínica y Dietética Hospitalaria**, v. 35, n. 2, p. 67–74, 2015.

SBP. **Consenso sobre anemia ferropriva: atualização: destaque 2021**. Ago. 2021. Disponível em: <<https://www.sbp.com.br/imprensa/detalhe/nid/consenso-sobre-anemia-ferropriva-atualizacao-destaques-2021/>>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SHI, L. *et al.* Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 1014–1022, 2017.

SILVA, E. DO N. DA; CADORE, S. Bioavailability Assessment of Copper, Iron, Manganese, Molybdenum, Selenium, and Zinc from Selenium-Enriched Lettuce. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 10, p. 2840–2846, 2019.

SILVA, H. T. DA; COSTA, A. O. **Caracterização Botânica de Espécies Silvestres do Gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae)**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa arroz e feijão, Dez, 2003. ISSN: 1678-9644 Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAP/21629/1/doc_156.pdf>. Acesso em: 07 de jan. de 2022.

SILVA, L. A. *et al.* Copper: Industrial production and applications. **Química Nova**, v. 42, n. 10, p. 1154–1161, 1 out. 2019.

SILVA, V. M. *et al.* Agronomic biofortification of cowpea with zinc: Variation in primary metabolism responses and grain nutritional quality among 29 diverse genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 162, n. January, p. 378–387, 2021.

SINGH, U. *et al.* Biofortification: Introduction, Approaches, Limitations, and Challenges. **Biofortification of Food Crops**, p. 1–490, 2016.

SKOOG, D. A. **Princípios De Análise Instrumental**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009.

SOARES, A. T. G. *et al.* The impact of manganese on neurotransmitter systems. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 61, 2020.

SÓCIO, S. DE A. *et al.* Doença de Wilson em crianças e adolescentes: diagnóstico e tratamento. **Rev Paul Pediat**, v. 28, n. 2, p. 134–140, 2010.

SOMBIÉ, P. A. E. D. *et al.* Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) genotypes from Burkina Faso. **Foods**, v. 7, n. 9, 2018.

SONG, M.; VOS, M. B.; MCCLAIN, C. J. Copper-fructose interactions: A novel mechanism in the pathogenesis of NAFLD. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–24, 2018.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

TAKO, E. *et al.* Studies of Cream Seeded Carioca Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from a Rwandan Efficacy Trial: In Vitro and In Vivo Screening Tools Reflect Human Studies and Predict Beneficial Results from Iron Biofortified Beans. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

TAYLOR, H. E. Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Practices and Techniques. In: San Diego, California: Academic Press, 2001. p. 1–162.

TORMENA, C. D. *et al.* Authentication of carioca common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) using digital image processing and chemometric tools. **Food Chemistry**, v. 364, n. March, 2021.

UFRJ. **Biomarcadores do estado de micr nutrientes: prevalências de deficiências e curvas de distribuição de micronutrientes em crianças brasileiras menores de 5 anos: ENANI 2019**. Rio de Janeiro-RJ: UFRJ, 2021. (156 p.). Disponível em: <https://enani.nutricao.ufrj.br/wp-content/uploads/2021/10/Relato%CC%81rio3_ENANI-2019_Biomarcadores_vfinal-1-3.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2022.

USDA, U. S. D. OF A. AND U. S. D. OF H. AND H. S. **Dietary Guidelines for Americans, 2020-2025**. 9th. ed. Washington, D.C:USDA, dez. 2020.

VALDÉS, S. T. *et al.* Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2104–2111, 2011.

WIESINGER, J. A. *et al.* The fast cooking and enhanced iron bioavailability properties of the manteca yellow bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2018.

ZHAO, F. J. *et al.* Toxic metals and metalloids: Uptake, transport, detoxification, phytoremediation, and crop improvement for safer food. **Molecular Plant**, v. 15, n. 1, p. 27–44, 2022.